

**Charakterisierung von TrmB und TrmBL1,
zwei Transkriptionsregulatoren im Zentrum des
Zuckerstoffwechsels von *Pyrococcus furiosus***



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Melanie Surma
aus Garching a. d. Alz

Regensburg, im Januar 2010

Promotionsgesuch eingereicht am: 12. Januar 2010

Prüfungskolloquium am: 17. März 2010

Diese Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Michael Thomm

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:

Prof. Dr. R. Wirth

1. Gutachter und Prüfer:

Prof. Dr. M. Thomm

2. Gutachter und Prüfer:

Prof. Dr. H. Tschochner

3. Prüfer:

Prof. Dr. R. Sterner

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Zuckertransport und Zuckermetabolismus in <i>P. furiosus</i>	2
2. Archaeelle Transkription und ihre Regulation	8
3. Der Transkriptionsregulator TrmB	14
4. Regulatoren der TrmB-Familie in <i>P. furiosus</i>	20
 II. Material und Methoden	 24
1. Material	24
1.1. Chemikalien	24
1.2. Nährmedien	26
1.2.1. Luria-Bertani (LB ₀)-Medium, pH 7,5	26
1.2.2. LB-Agar (1,8%), pH 7,5	26
1.3. Puffer und Lösungen	26
1.3.1. Puffer und Lösungen für die Präparation von Proteinen	26
1.3.2. Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophoresen	27
1.3.3. Puffer und Lösungen für die Reinigung der RNA-Polymerase	28
1.3.4. Puffer und Lösungen für Agarose-Gele	30
1.3.5. Puffer und Lösungen für <i>in vitro</i> Transkription	30
1.3.6. Puffer für die Immobilisierung von DNA mit Streptavidin Magnetic Particles	32
1.3.7. Puffer und Lösungen für EMSA	32
1.3.8. Puffer und Lösungen für DNaseI Footprinting	33
1.3.9. Sonstige Lösungen	34
1.4. Bakterienstämme	34
1.5. Plasmide	34
1.6. Enzyme und andere Proteine	35
1.7. Kits	36
1.8. Oligonukleotide	36

2. Methoden	38
2.1. Reinigung der Transkriptionsregulatoren	38
2.1.1. Expression	38
2.1.2. Zellaufschluss und Hitzefällung	39
2.1.3. Ni-NTA-Affinitätschromatographie	39
2.1.4. Proteinkonzentrationsbestimmung nach BRADFORD	41
2.1.5. Herstellung von TrmB- bzw. TrmBL1-Mutanten durch Site Directed Mutagenesis	41
2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.3. Aufreinigung der RNA-Polymerase aus <i>P. furiosus</i>	44
2.4. Herstellung von DNA-Matrizen für <i>in vitro</i> Versuche	46
2.4.1. Amplifikation von DNA-Matrizen für <i>in vitro</i> Transkriptions- Versuche mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
2.4.2. Klonierung von DNA-Matrizen	48
2.4.3. Herstellung immobilisierter DNA-Matrizen	49
2.4.4. Herstellung radioaktiv markierter DNA-Matrizen	50
2.5. <i>In vitro</i> Transkriptionsversuche	51
2.6. Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)	52
2.7. DNaseI Footprinting	52
2.7.1. Herstellung eines Sequenzstandards	53
III. Ergebnisse	55
1. TrmB reguliert die Transkription von TM- und MD-Promotor induktorspezifisch	55
1.1. Die Trehalose/Maltose (TM)-Promotor-Matrize	55
1.2. Bestimmung der TrmB-Bindestellen des TM-Promotors durch DNaseI Footprinting	56
1.3. Die Maltodextrin (MD)-Promotor-Matrize	58
1.4. Bestimmung der TrmB-Bindestelle des MD-Promotors durch DNaseI Footprinting	59
1.5. <i>In vitro</i> Transkriptionsversuche mit TrmB am TM- und MD-Promotor in Anwesenheit verschiedener Zucker	61

2. Die Nukleotidsequenz der TrmB-Bindestelle bestimmt die Bindeaffinität und Induktorspezifität des Regulators	64
2.1. Mutationsanalyse der TrmB-Bindestelle des TM-Promotors	64
2.2. <i>In vitro</i> Transkriptionsversuche am MDTA-Promotor	67
3. Anti-Induktoren am TM- und MD-Promotor	68
3.1. Glucose, Maltotriose und Sucrose sind Anti-Induktoren am TM-Promotor	69
3.2. Glucose und Maltose sind Anti-Induktoren am MD-Promotor	72
4. TrmBL1 ist ein Repressor der Glycolyse und autoreguliert seine eigene Expression	74
4.1. Die PFK (PF1784)-Promotor-Matrize	75
4.2. Bestimmung der TrmBL1-Bindestelle des PFK-Promotors durch DNaseI Footprinting	76
4.3. TrmBL1 hemmt die Transkription am PFK-Promotor	77
4.4. Maltose, Maltotriose und Fructose sind Induktoren für TrmBL1 am PFK-Promotor	79
4.5. TrmBL1 autoreguliert seine eigene Expression	84
4.6. Glucose ist ein Induktor für TrmBL1 am TrmBL1-Promotor	86
5. TrmB erkennt die Zielpromotoren von TrmBL1 und umgekehrt	87
5.1. TrmB reprimiert die Transkription am PFK- und TrmBL1-Promotor	87
5.2. TrmBL1 reprimiert die Transkription am MD- und TM-Promotor mit Maltose als Induktor	92
6. TrmBL1 ist ein Aktivator der Gluconeogenese	96
6.1. Die FB Pase (PF0613)-Promotor-Matrize	96
6.2. Bestimmung der TrmBL1-Bindestelle des FB Pase-Promotors durch DNaseI-Footprinting	98
6.3. TrmBL1 aktiviert die Transkription am FB Pase-Promotor	99

7. TrmB und TrmBL1 besitzen mehrere DNA-Bindehelices innerhalb ihrer DNA-Bindedomänen	104
7.1. TrmB bindet mit verschiedenen Helices an TM- und MD-Promotor	105
7.2. <i>In vitro</i> Versuche mit TrmB Y50N und TrmB E87A am Doppelpromotor TMMD	111
7.3. TrmBL1 bindet mit unterschiedlichen Helices an Promotoren mit und ohne TGM	115
IV. Diskussion	121
1. TrmB reguliert das TM- und MD-System	121
2. TrmBL1 ist ein multifunktionaler Regulator des Zuckerstoffwechsels in <i>P. furiosus</i>	129
3. TrmB und TrmBL1 besitzen zwei DNA-Bindehelices	135
4. TrmB und TrmBL1 stehen im Zentrum eines komplexen Regulationsnetzwerks innerhalb des Zuckermetabolismus von <i>P. furiosus</i>	137
V. Zusammenfassung	143
VI. Summary	145
VII. Literaturverzeichnis	147
VIII. Anhang	163
1. Abkürzungen	163
1.1. Allgemeine Abkürzungen	163
1.2. Symbole für den Nukleinsäurecode	166
1.3. Symbole für Aminosäuren	166
2. Danksagung	167
3. Erklärung	168

I. Einleitung

Der Stammbaum des Lebens lässt sich in die drei Domänen *Bacteria*, *Archaea* und *Eukarya* einteilen, wobei die *Bacteria* und *Archaea* zu den Prokaryoten gezählt werden (Woese *et al.*, 1990). Die *Archaea* lassen sich in die drei Reiche *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* und *Korarchaeota* aufteilen. Sie nehmen eine Sonderstellung ein, da sie sowohl mit den *Bacteria* als auch mit den *Eukarya* Gemeinsamkeiten aufweisen und so ein Bindeglied zwischen diesen Domänen darstellen (Keeling *et al.*, 1995). Viele Archaeen zeichnen sich durch ihre Anpassung an extreme Umweltbedingungen aus, was sie zu interessanten Forschungsobjekten werden lässt. So findet man unter ihnen extrem halophile, acidophile, alkaliphile sowie hyperthermophile Organismen.

Im Zentrum dieser Arbeit steht das Archaeum *Pyrococcus furiosus*, der „rasende Feuerball“ (Abb. 1). Es handelt sich dabei um einen der am besten untersuchten hyperthermophilen Organismen aus dem Reich der *Euryarchaeota*.

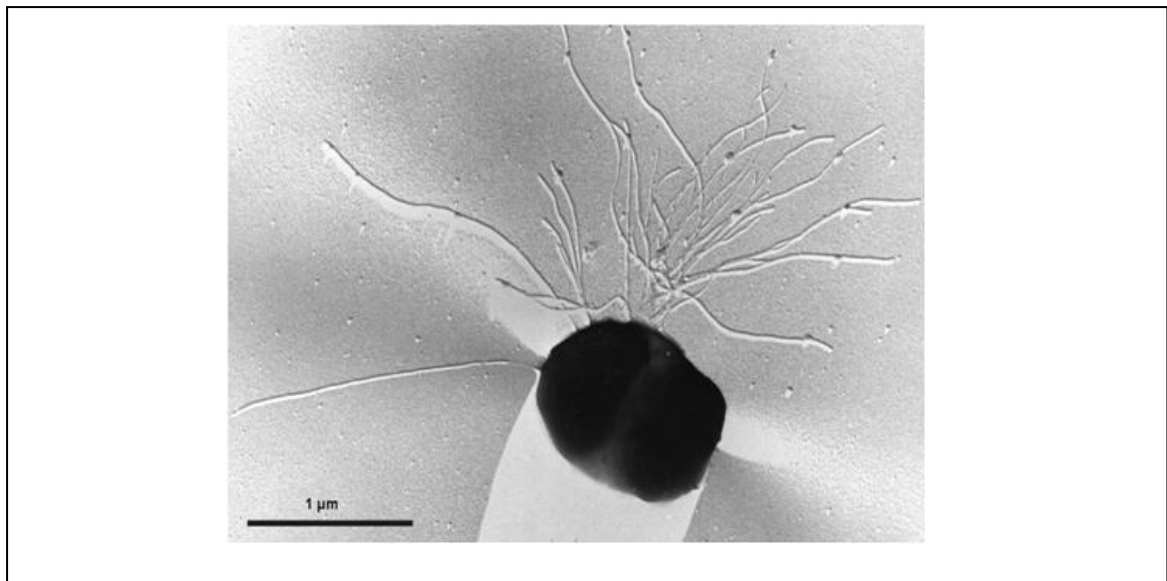


Abb.1: *Pyrococcus furiosus*.

Elektronenmikroskopische Aufnahme des hyperthermophilen Archaeums *Pyrococcus furiosus* (K.O. Stetter, Reinhard Rachel).

Ein Organismus wird als hyperthermophil bezeichnet, wenn seine optimale Wachstumstemperatur bei über 80°C liegt. Als Konsequenz müssen ihre Zellkomponenten thermostabil und ihre Proteine auch bei extrem hohen Temperaturen funktionstüchtig sein (Stetter, 1999). Mit einem Wachstumsoptimum

von 100°C dient *Pyrococcus furiosus* als Modellorganismus zur Untersuchung von Thermoadaptation und Genexpression bei extremen Temperaturen.

P. furiosus ist ein Vertreter der Ordnung *Thermococcales* und wurde erstmals aus geothermal erhitzten Meeressedimenten am Strand von Porto di Levante auf der Insel Vulcano in Italien isoliert (Fiala und Stetter, 1986). Die kokkoiden, beweglichen Zellen besitzen eine Verdopplungszeit von nur 37 Minuten, sind zwischen 0,8 und 2,5 µm groß und monopolar polytrich begeißelt. Das Genom von *P. furiosus* wurde vollständig sequenziert, besitzt eine Größe von ca. 1,9 Mb und enthält 2192 offene Leseraster (Poole *et al.*, 2005).

Bei *P. furiosus* handelt es sich um einen strikt anaeroben Organismus, der heterotroph auf einer Reihe von Substraten wachsen kann, darunter Hefextrakt, Pepton, Trypton und Pyruvat. Als Stoffwechselprodukte entstehen dabei Acetat, CO₂, H₂ und Laktat. Die durch höhere H₂-Konzentrationen verursachte Wachstums- hemmung wird bei Anwesenheit von Schwefel und damit verbundener Bildung von H₂S umgangen (Fiala und Stetter, 1986).

Neben den bereits genannten Substraten kann *P. furiosus* aber auch saccharolytisch auf Maltose, Maltodextrinen und Stärke als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen.

1. Zuckertransport und Zuckermetabolismus in *P. furiosus*

Wächst *P. furiosus* auf Kohlenhydraten wie Maltose und Maltodextrinen, erfolgt die Aufnahme dieser Zucker in die Zelle über so genannte bindeproteinabhängige, substratspezifische ABC-Transporter (Koning *et al.*, 2001 und 2002). Diese beziehen die für den Substrattransport notwendige Energie aus der Hydrolyse von ATP.

ATP-Transporter (ABC=**A**TP **B**inding **C**assette) setzen sich aus drei verschiedenen Proteintypen zusammen (Abb. 2). Der Translokationskanal wird von zwei hydrophoben Permeasen gebildet, welche die Membran durchziehen. Durch ihn gelangt das Substrat in die Zelle. Auf der Cytoplasmaseite der Membran befinden sich zwei ATPase-Domänen, die Energie zur Translokation des Substrats durch Hydrolyse von ATP bereitstellen. Auf der extrazellulären Seite der Cytoplasmamembran befindet sich schließlich ein substratspezifisches Bindeprotein, das über einen Lipidlinker oder eine hydrophobe Domäne in der Membran verankert ist. Die Bindedomäne des Proteins setzt sich aus zwei Lappen zusammen, die das Substrat spezifisch erkennen, aus dem Medium „fangen“ und zum Translokationskanal transportieren.

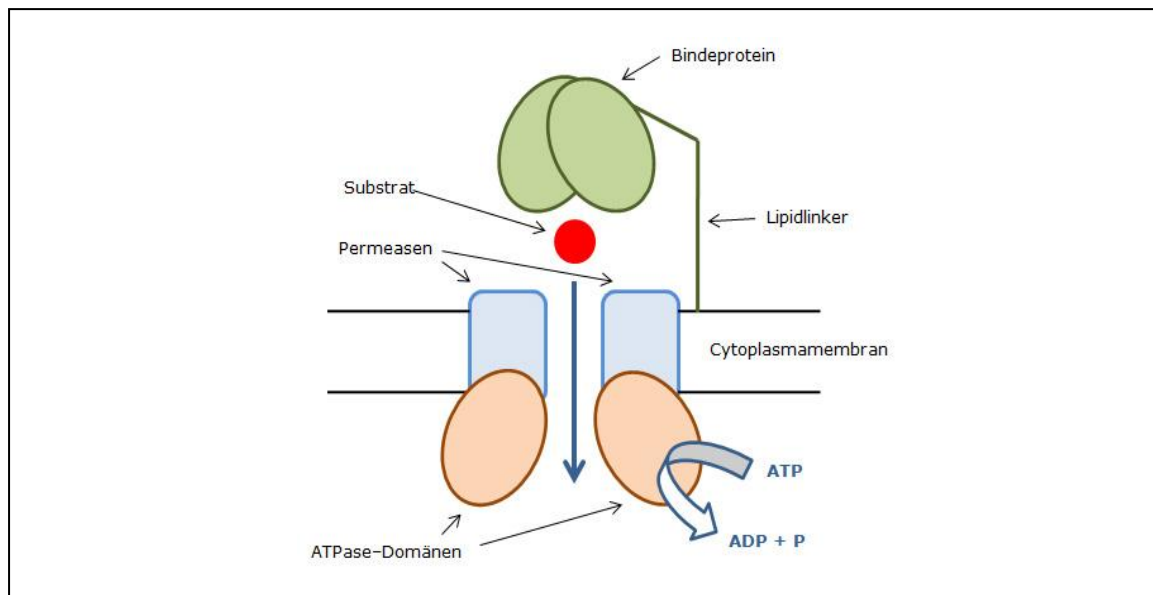


Abb.2: Aufbau des ABC-Transporters.

ABC-Transporter setzen sich aus zwei hydrophoben, transmembranen Permeasen, zwei intrazellulären ATPase-Domänen und einem extrazellulären, substratspezifischen Bindeprotein zusammen.

Das Bindeprotein erkennt und bindet das Substrat dabei mit hoher Affinität ($K_m = 20\text{--}150\text{ nM}$). In extremen Biotopen mangelt es oft an Kohlenstoffquellen. Deshalb ist die hohe Substrataffinität und -spezifität von ABC-Transportern für Archaeen von großem Vorteil. Im Gegensatz zu Sekundärtransportern, bei welchen das Substrat lediglich über ein Gradientengefälle zwischen extra- und intrazellulärem Raum in die Zelle transportiert wird, kann das gewünschte Substrat mit Hilfe des spezifischen Bindeproteins quasi aktiv aus dem Medium eingefangen und in die Zelle transportiert werden.

In *P. furiosus* konnten bisher zwei substratspezifische ABC-Transportsysteme identifiziert werden. Es handelt sich dabei einerseits um einen Trehalose/Maltose (TM)-ABC-Transporter, der spezifisch die Aufnahme von Trehalose und Maltose ermöglicht, jedoch keine anderen Zucker transportieren kann (Xavier *et al.*, 1996; Horlacher *et al.*, 1998). Andererseits besitzt *P. furiosus* einen Maltodextrin (MD)-Transporter, der homolog zum TM-System ist, jedoch ausschließlich für die Translokation von Maltodextrinen verantwortlich zeichnet. Maltose und Trehalose werden hier nicht als Substrate erkannt (DiRuggiero *et al.*, 2000; Koning *et al.*, 2002). Beide Transportsysteme werden induziert, wenn das entsprechende Substrat im Medium vorhanden ist. Aufgrund der hohen Substrataffinität der Transportsysteme sprechen diese bereits bei sehr geringen Substratmengen an. So konnte die Substratbindedomäne des MD-Transporters mit

gebundener Maltotriose kristallisiert werden, obwohl die Lösung, aus der es gewonnen wurde, als einzigen Zucker Maltose enthielt. Dies demonstriert die hohe Substratspezifität des Bindeproteins zu Maltotriose, die meist als Verunreinigung in Maltose enthalten ist (Evdokimov *et al.*, 2001).

Die Gene, welche für die verschiedenen Untereinheiten des TM- bzw. MD-ABC-Transporters kodieren, sind jeweils in einem Operon zusammengefasst und werden gemeinsam reguliert. Der TM-Gencluster befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft eines Gens, das eine Fructokinase kodiert und in entgegengesetzte Richtung transkribiert wird (Lee *et al.*, 2003). Er setzt sich aus den Genen *malE*, *malF*, *malG*, *treT*, *trmB* und *malK* zusammen (Abb. 3A). Dabei kodiert *malE* für das Bindeprotein (PF1739), *malF* und *malG* für die integralen Permeasen (PF1740 und PF1741) und *malK* für die ATPase-Untereinheit (PF1744) des TM-Transporters (Horlacher *et al.*, 1998). Das TM-Operon wurde erstmals in *Thermococcus litoralis* nachgewiesen, einem weiteren hyperthermophilen Vertreter der Ordnung *Thermococcales* (Neuner *et al.*, 1990). Später wurde dasselbe System auch in *P. furiosus* entdeckt (DiRuggiero *et al.*, 2000). Das TM-Operon von *P. furiosus* ist identisch mit dem TM-Operon von *T. litoralis*. Dies ist auf einen lateralen Gentransfer zwischen beiden Organismen zurückzuführen, bei dem ein mit zwei Transposons flankiertes 16kb-DNA-Fragment, das den TM-Gencluster enthält, von *T. litoralis* auf *P. furiosus* übertragen wurde (DiRuggiero *et al.*, 2000). Das TM-System ist dabei dem Maltose-Transportsystem von *Escherichia coli* sehr ähnlich (Horlacher *et al.*, 1998) und höchstwahrscheinlich bakteriellen Ursprungs.

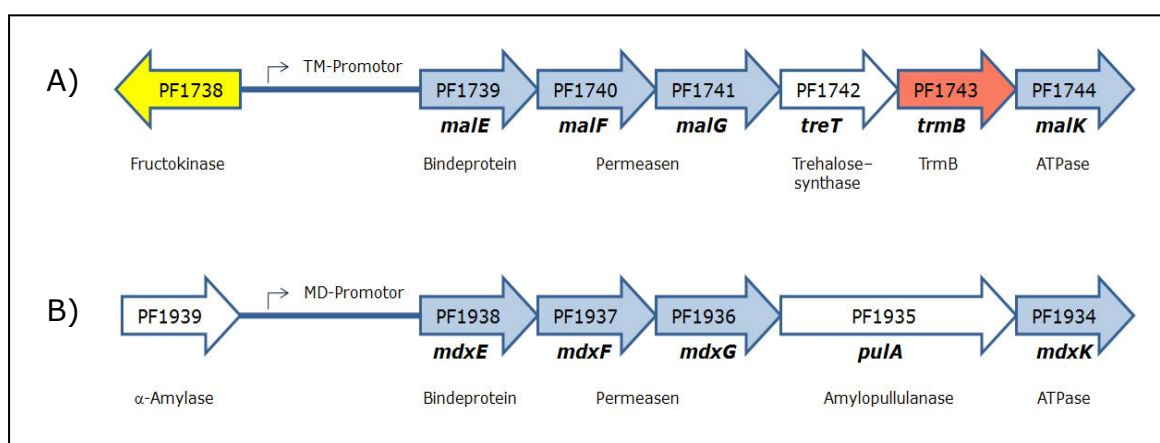


Abb.3: TM- und MD-Gencluster.

A) Gencluster des Maltose/Trehalose (TM)-ABC-Transporters von *P. furiosus*. Gene, die für Untereinheiten des Transporters kodieren, sind blau unterlegt. Das *trmB*-Gen ist ebenfalls Teil des TM-Operons und rot dargestellt. Das Gen für die Fructokinase wird in entgegengesetzte Richtung zum TM-Operon transkribiert und ist gelb unterlegt.

B) Gencluster des Maltodextrin (MD)-ABC-Transporters von *P. furiosus*. Gene, die für Untereinheiten des Transporters kodieren, sind blau unterlegt.

Der MD-Gencluster von *P. furiosus* setzt sich aus den Genen *mdxE*, *mdxF*, *mdxG*, *pulA* und *mdxK* zusammen (Abb. 3B). Das Gen *mdxE* kodiert dabei für das Bindeprotein (PF1938), *mdxF* und *mdxG* für die transmembranen Permeasen (PF1937 und PF1936) und *mdxK* für die ATPase-Domäne (PF1934) des MD-Transporters. Im Gegensatz zum TM-System entstand das MD-System wohl innerhalb der Archaeen (Noll *et al.*, 2008). Es besteht die Vermutung, dass es sich beim MD-System von *P. furiosus* ursprünglich um einen TM/MD-Transporter handelte, der sich nach der Übertragung des 16kb-Fragments aus *T. litoralis* auf Maltodextrine spezialisierte (DiRuggiero *et al.*, 2000). Auch in *T. litoralis* konnte mittlerweile ein Gencluster identifiziert werden, der für einen MD-ABC-Transporter kodiert und dasselbe Genarrangement wie das MD-System in *P. furiosus* aufweist. Beide Transporter besitzen allerdings nur 51–83% Aminosäure-Sequenzidentität (Imamura *et al.*, 2004).

Obwohl *P. furiosus* Glucose verstoffwechselt, besitzt er interessanterweise keinen Glucose-Transporter und ist demnach auch nicht in der Lage, Glucose als Kohlenstoffquelle zu nutzen (Kengen *et al.*, 1995). Die Glucose wird deshalb über eine Weiterverarbeitung der über die entsprechenden Transporter aufgenommenen Zucker wie Maltose und Maltodextrine bereit gestellt. Es gibt mehrere Enzyme, die im Stoffwechsel von Maltose und Maltodextrinen eine Rolle spielen (Abb. 4). Enzyme, die beim Wachstum auf Stärke induziert werden, sind die Amylopullulanase (PF1935), die Teil des MD-Genclusters ist und zusammen mit diesem exprimiert wird (vgl. Abb. 3B), die 4- α -Glucanotransferase (PF0272) und die Maltodextrin-Phosphorylase (PF1535). Die extrazelluläre Amylopullulanase hydrolysiert Stärke zu Maltodextrinen und Maltose, die dann über den MD- bzw. TM-Transporter in die Zelle geschleust werden (Brown und Kelly, 1993; Lee *et al.*, 2006). Über die Aktivität der 4- α -Glucanotransferase wird Glucose aus Maltodextrinen und Maltose gebildet, während die Maltodextrin-Phosphorylase Maltodextrine zu Glucose-1-Phosphat spaltet (Xavier *et al.*, 1999). In Zellextrakten konnte außerdem die Aktivität einer α -Glucosidase nachgewiesen werden, die Maltose zu Glucose hydrolysiert (Costantino *et al.*, 1990; Xavier *et al.*, 1999). Des Weiteren findet sich im TM-Operon das Gen *treT* (vgl. Abb. 3A), das für eine Trehalose-Synthase (PF1742) kodiert und in Anwesenheit von Maltose bzw. Trehalose im Medium zusammen mit dem TM-System exprimiert wird. Es wird vermutet, dass dieses Enzym in *P. furiosus* die Aufspaltung von Trehalose in ADP-Glucose und Glucose katalysiert (Qu *et al.*, 2004a). Aus ADP-Glucose werden anschließend Glucogen und lineare Maltodextrine gebildet, die über die Aktivität einer Glucogen bzw. Maltodextrin-Phosphorylase in Glucose-1-Phosphat umgewandelt werden (Mizanur *et al.*, 2007).

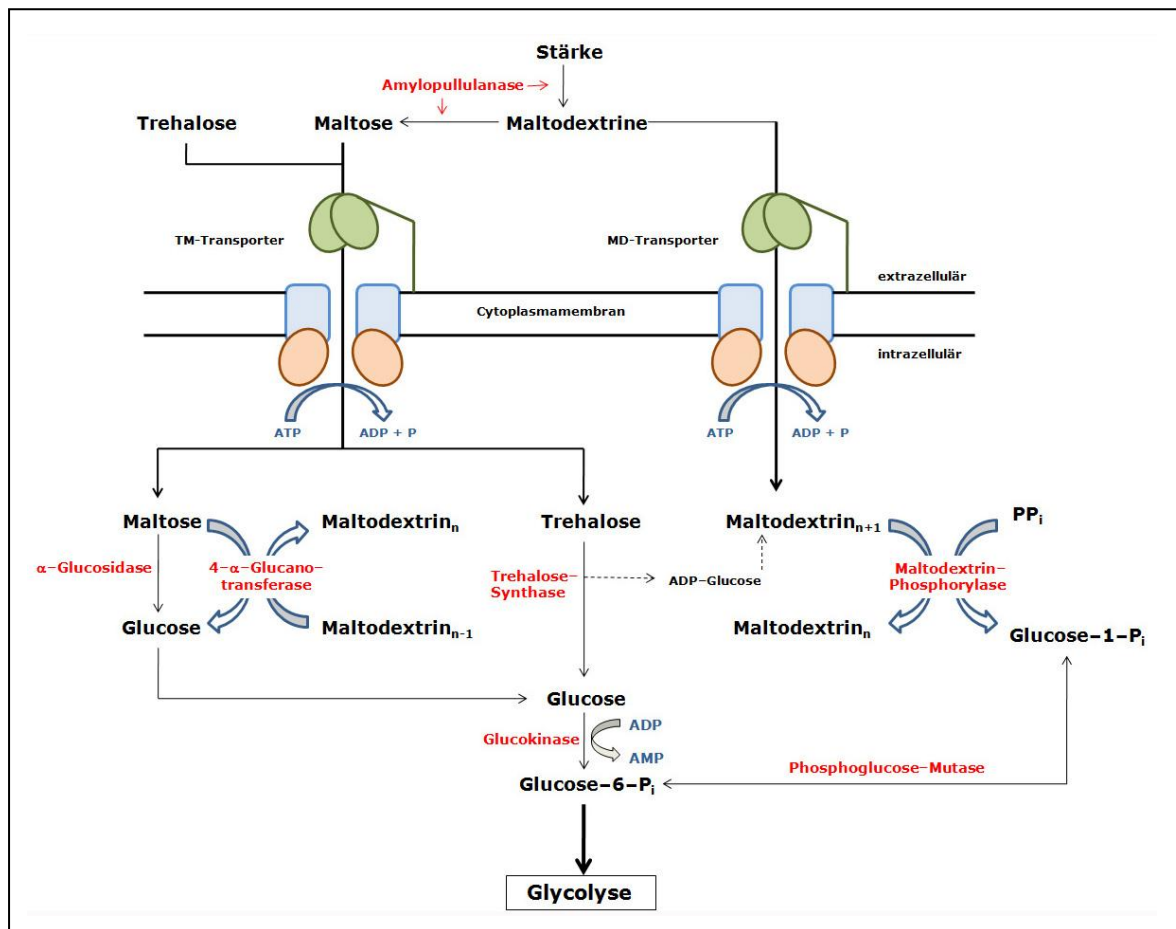


Abb.4: Maltose- und Maltodextrin-Metabolismus in *Pyrococcus furiosus*.

Stärke wird extrazellulär durch eine Amylopullulanase in Maltodextrine und Maltose aufgespalten, die dann über die spezifischen Transportsysteme in die Zelle transportiert werden. Im Cytoplasma erfolgt die Umwandlung zu Glucose und Glucose-1-Phosphat über verschiedene Schlüsselenzyme (rot dargestellt). (nach Lee et al., 2006; modifizierte Darstellung)

Eine Phosphoglucose-Mutase katalysiert schließlich die Umlagerung von Glucose-1-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat.

Die weitere Verstoffwechslung von Glucose bzw. Glucose-6-Phosphat zu Pyruvat erfolgt in *P. furiosus* über einen modifizierten Embden-Meyerhof-Weg (Abb. 5A). Der Hauptunterschied zur herkömmlichen Glycolyse in *Bacteria* und *Eukarya* besteht darin, dass hier nicht ATP-, sondern ADP-abhängige Kinasen zum Einsatz kommen, darunter eine ADP-abhängige Glucokinase (PF0312) und Phosphofructokinase (PF1784) (Siebers und Schönheit, 2005). Des Weiteren wird in *P. furiosus* eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Ferredoxin Oxidoreduktase verwendet, welche die Umwandlung von Glycerin-3-Phosphat in 3-Phosphoglycerat in nur einem Schritt katalysiert und Ferredoxin anstelle von NAD^+ als Oxidationsmittel benutzt

(Verhees *et al.*, 2003). Die Gluconeogenese ist eine Umkehrung der Glycolyse, bei der aus Pyruvat Glucose-6-Phosphat synthetisiert wird (Abb. 5B). Viele Enzyme der Glycolyse katalysieren dabei ihre Reaktionen reversibel und kommen so auch bei der

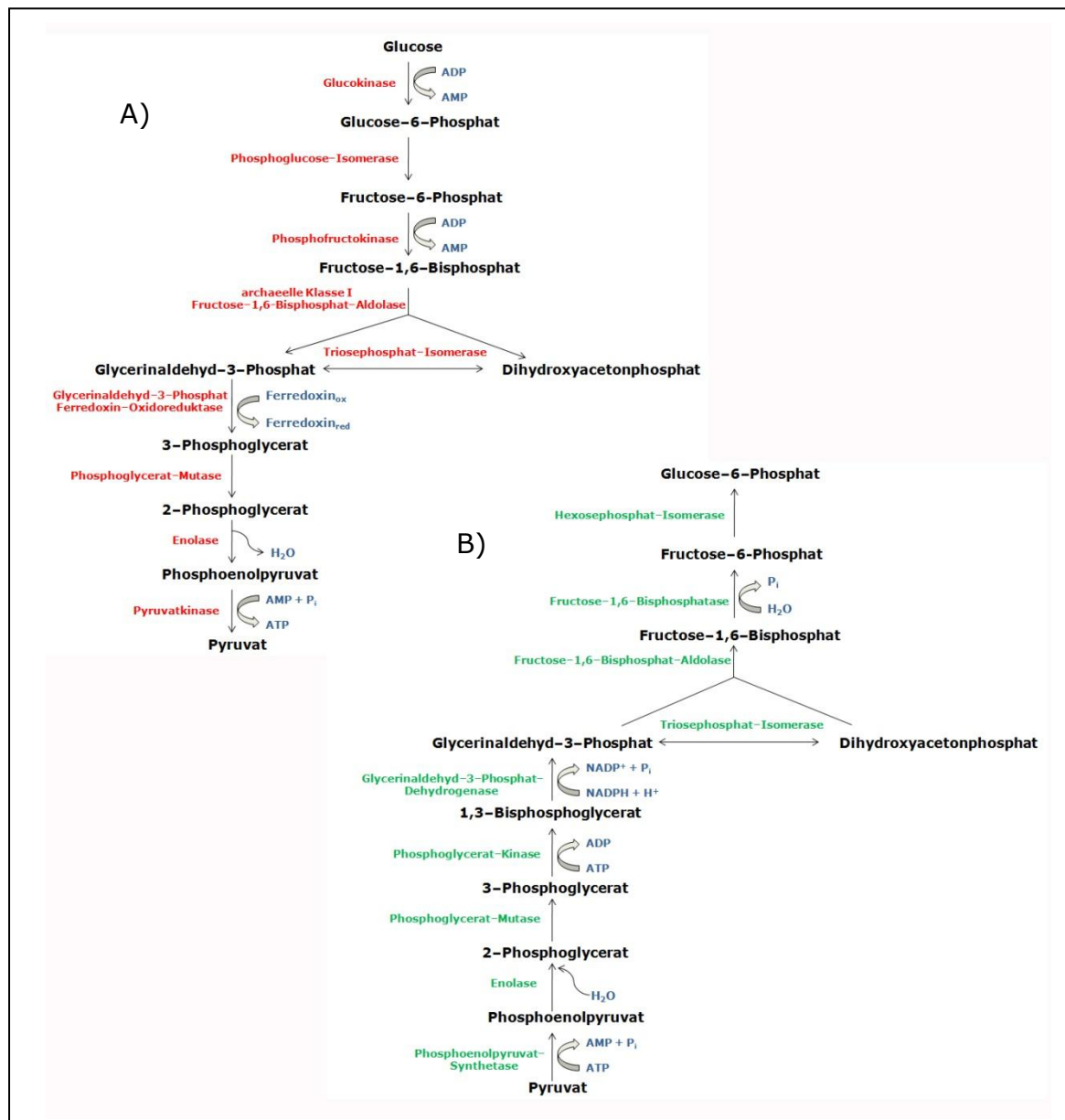


Abb.5: Glycolyse (A) und Gluconeogenese (B) in *Pyrococcus furiosus*.

Enzyme der Glycolyse (modifizierter Embden-Meyerhof-Weg) sind rot (A), Enzyme der Gluconeogenese grün (B) dargestellt. (nach Verhees *et al.*, 2003).

Gluconeogenese zum Einsatz. Einige glycolytische Reaktionen sind jedoch nicht umkehrbar. Für sie werden in der Gluconeogenese spezifische Enzyme benötigt. In *P. furiosus* sind dies die Phosphoenolpyruvat-Synthetase, welche die Phosphorylierung von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat katalysiert, die

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (PF1874), die für die Umwandlung von 1,3-Bisphosphoglycerat in Glycerinaldehyd-3-Phosphat zuständig ist, und die Fructose-1,6-Bisphosphatase (PF0613), welche die Dephosphorylierung von Fructose-1,6-Bisphosphat in Fructose-6-Phosphat katalysiert (Verhees *et al.*, 2003). Schut *et al.* untersuchten 2003 mit Hilfe von Microarray-Versuchen die Genexpression in *P. furiosus*-Zellen, die auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen gezogen wurden. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass die Expressionsrate von gluconeogenetischen Enzymen in Zellen, die auf Peptiden gezogen wurden, deutlich höher war als in Zellen, die auf Kohlenhydraten wuchsen. Für Enzyme der Glycolyse war das genaue Gegenteil der Fall. Hier wurde die Expression bei Wachstum auf Kohlenhydraten hochreguliert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass in *P. furiosus* glycolytische und gluconeogenetische Enzyme, sowie TM- und MD-System auf Transkriptionsebene kontrolliert werden.

2. Archaeelle Transkription und ihre Regulation

Die Transkription von DNA in mRNA ist ein fundamentaler biologischer Prozess und spielt eine essentielle Rolle bei der Genexpression (Soppa, 1999). Bakterielle und eukaryotische Transkriptionsinitiation, sowie die Promotorelemente unterscheiden sich dabei grundlegend voneinander. Die Genexpression in *Archaea* basiert auf einer Transkriptionsmaschinerie, die derjenigen der Eukaryoten sehr ähnlich ist (Thomm, 1996). Die Domäne der *Bacteria* spaltete sich früh in der Evolution vom gemeinsamen Vorfahren ab, während sich *Archaea* und *Eukarya* erst später zu separaten Domänen entwickelten. Der archaeelle bzw. eukaryotische Expressionsapparat scheint demnach erst nach der Abspaltung der *Bacteria*, aber noch vor der Trennung von *Archaea* und *Eukarya* entstanden zu sein.

Der bakterielle Promotor setzt sich aus einer -35-Box und der so genannten Pribnow-Box zusammen, die sich -10 Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstarts befindet (Soppa, 1999) (Abb. 6A). Im Gegensatz dazu besteht sowohl der eukaryotische als auch der archaeelle Promotor aus drei Elementen: der TATA-Box, dem BRE (Transcription Factor **B** **R**ecognition)-**E**lement sowie einem im Bereich des Transkriptionsstarts lokalisierten Initiator-Element (INR), das eine Pyrimidin-Purin-Dinukleotidsequenz besitzt. Bei der TATA-Box handelt es sich um eine A/T-reiche Sequenz, die etwa -25 Basen stromaufwärts des Transkriptionsstarts gelegen ist (Hausner und Thomm, 2001).

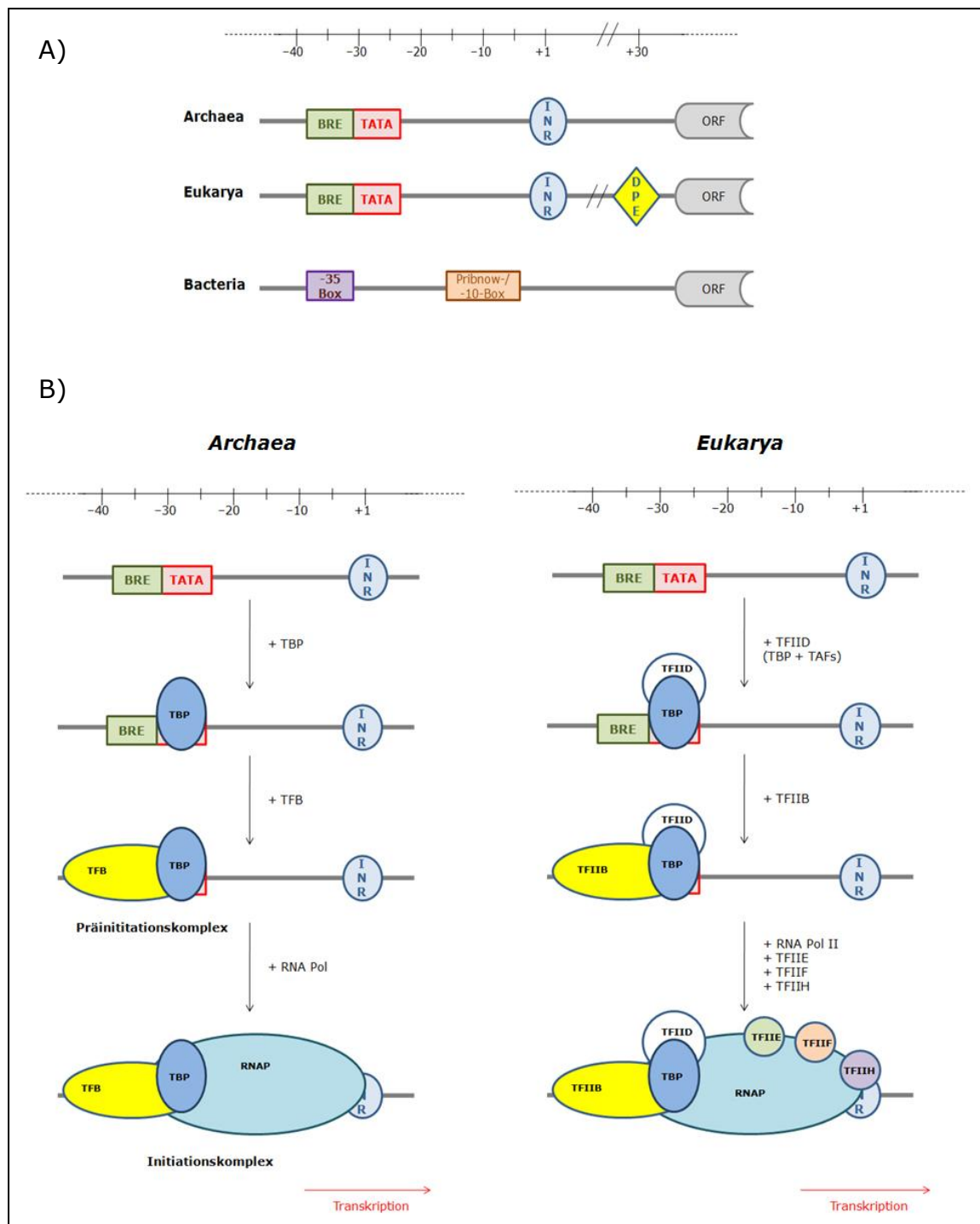


Abb.6: Transkriptionsinitiation bei *Archaea* und *Eukarya* im Vergleich.

A) Vergleich der Promotorelemente von *Bacteria*, *Archaea* und *Eukarya*. Die Promotoren in *Archaea* und *Eukarya* sind aus ähnlichen Elementen aufgebaut. Beide besitzen eine TATA-Box, ein BRE-Element und ein Initiator-Element (INR). Der Promotor bei *Eukarya* enthält zusätzlich ein DPE-Element stromabwärts des Transkriptionsstarts. Im Gegensatz dazu besteht der bakterielle Promotor aus einer -35-Box und einer sog. Pribnow-Box. (nach Soppa, 1999)

B) Transkriptionsinitiation bei *Archaea* (links) und *Eukarya* (rechts). Zuerst erfolgt die Bindung von TBP und TFB (*Archaea*) bzw. TBP, TFIID und TFIIB (*Eukarya*) an die BRE/TATA-Region. Anschließend wird die RNA-Polymerase rekrutiert. Bei *Eukarya* sind dazu noch eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren notwendig. (nach Thomm, 1996)

Das Purin-reiche BRE-Element schließt sich stromaufwärts direkt an die TATA-Box an und besteht gewöhnlich aus sechs Nukleotiden. Bei eukaryotischen Promotoren findet man stromabwärts des Transkriptionsstarts außerdem häufig ein DPE (**D**ownstream **P**romotor)-**E**lement, das bei Archaeen jedoch fehlt (Abb. 6A) (Soppa, 1999; Hausner *et al.*, 1996). Bei der Transkriptionsinitiation in *Bacteria* wird die aus nur vier Untereinheiten bestehende RNA-Polymerase mit Hilfe eines σ -Faktors an den Promotor eines Gens geführt (Campell *et al.*, 2008). Weitere Transkriptionsfaktoren sind bei der bakteriellen Transkriptionsinitiation nicht notwendig. Im Gegensatz dazu benötigen *Archaea* und *Eukarya* zusätzlich bestimmte Transkriptionsfaktoren für eine erfolgreiche Rekrutierung der RNA-Polymerase (Abb. 6B). Im Falle der Archaeen sind dies die Faktoren TBP (**T**ATA-Box **B**inding **P**rotein) und TFB (**T**ranscription **F**actor **B**). Diese sind in funktioneller und struktureller Hinsicht homolog zu den eukaryotischen Transkriptionsfaktoren TBP und TFIIB (Hausner *et al.*, 1996).

Der erste Schritt in der archaeellen Transkriptionsinitiation ist die Bindung von TBP an die TATA-Box (Ouhammouch *et al.*, 2003; Gohl *et al.*, 1995; Rowlands *et al.*, 1994). TFB erkennt daraufhin den TBP/DNA-Komplex und stabilisiert diesen durch Bindung an TBP und die Promotor-DNA. TFB nimmt dabei im Bereich des BRE-Elements Kontakt mit der DNA auf (Hausner *et al.*, 1996). Die Wechselwirkung zwischen BRE-Element und TFB bestimmt die Orientierung des Initiationskomplexes und somit die Richtung der Transkription (Hausner und Thomm, 2001). Der binäre Komplex aus TBP und TFB (Präinitiationskomplex) dient als Plattform für die Rekrutierung der RNA-Polymerase (RNAP). Sobald sich mit Anlagerung der RNA-Polymerase der Initiationskomplex gebildet hat, kann die Transkription beginnen (Bartlett *et al.*, 2004). Im Gegensatz zur bakteriellen RNAP, die lediglich aus vier Untereinheiten besteht, besitzt die archaeelle RNAP mit ihren 10 bis 12 Untereinheiten eine ähnlich komplexe, multimere Struktur wie die eukaryotische RNA-Polymerase II (Thomm, 1996). Allerdings besitzen *Archaea* wie *Bacteria* nur eine RNA-Polymerase, während in *Eukarya* drei RNAPs zu finden sind (RNAP I, II und III) (Thomm, 1996). Neben TBP, TFIIB und RNAPII sind bei der eukaryotischen Transkriptionsinitiation noch eine Reihe weiterer Faktoren notwendig (Woychik und Hampsey, 2002), während bei Archaeen die Faktoren TBP und TFB zusammen mit der RNAP an vielen Promotoren für die zellfreie Transkriptionsinitiation ausreichend sind (Hausner *et al.*, 1996).

Bei schwachen archaeellen Promotoren mit suboptimaler Wechselwirkung von TBP und TATA-Box kann der Einsatz eines weiteren Transkriptionsfaktors, TFE (**T**ranscription **F**actor **E**), eine stimulierende Wirkung auf die Transkription ausüben. TFE ist homolog zur α -Untereinheit des eukaryotischen Transkriptionsfaktors TFIIE

(Bell und Jackson, 2001). Doch auch wenn TFE bei der zellfreien Transkription nicht notwendig ist, konnten Untersuchungen, die 2007 von Grünberg *et al.* durchgeführt wurden, belegen, dass TFE bei der Transkriptionsinitiation *in vivo* eine wichtige Rolle spielt, indem es den offenen Komplex stabilisiert und direkt mit TBP und der RNA-Polymerase interagiert.

Obwohl der Ablauf der archaeellen Transkription und die daran beteiligten Komponenten viele Gemeinsamkeiten mit dem System der *Eukarya* aufweisen und somit quasi eine vereinfachte Form der eukaryotischen Transkriptionsmaschinerie darstellen (Thomm, 1996), ist der Regulationsmechanismus der Transkription in Archaeen dem bakteriellen System sehr ähnlich. So konnten in *Archaea* eine Reihe von Transkriptionsregulatoren identifiziert werden, die homolog zu bakteriellen Regulatorproteinen sind (Ouhammouch, 2004; Kyrpides und Ouzounis, 1999; Aravind und Koonin, 1999). Darüber hinaus gibt es aber auch sowohl archaeenspezifische, als auch einige zu eukaryotischen Proteinen homologe Regulatoren. Da immer mehr archaeelle Genome sequenziert werden, wächst auch die Anzahl potentieller Transkriptionsregulatoren, von welchen einige bereits auf molekularer Ebene charakterisiert wurden (Ouhammouch, 2004; Bell, 2005; Geiduschek und Ouhammouch, 2005). In Tabelle 1 sind eine Reihe der wichtigsten, bisher untersuchten archaeellen Transkriptionsregulatoren und ihre Wirkungsweise zusammengestellt. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Repressoren, welche die Transkription hemmen, indem sie im Bereich der BRE/TATA-Region oder im Bereich des Transkriptionsstarts an den Promotor binden und so die Anlagerung der Transkriptionsfaktoren bzw. die Rekrutierung der RNA-Polymerase verhindern. Es gibt aber auch einige Beispiele archaeeller Regulatorproteine, welche die Transkription aktivieren können, indem sie an Bereiche stromaufwärts der BRE/TATA-Region binden und die Rekrutierung von TBP ermöglichen bzw. erleichtern (Ouhammouch *et al.*, 2003). Bei der Transkriptionsregulation sind außerdem häufig spezifische Effektoren beteiligt, welche die Bindeaffinität des jeweiligen Regulators an die Promotor-DNA beeinflussen.

Beispiele archaeeller Repressoren sind u.a. LrpA von *Pyrococcus furiosus* (Brinkman *et al.*, 2000; Dahlke und Thomm, 2002), Lrs14 von *Sulfolobus solfataricus* (Napoli *et al.*, 1999; Bell und Jackson, 2000), MDR1 von *Archaeoglobus fulgidus* (Bell *et al.*, 1999) und TrpY von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (Xie und Reeve, 2005). Bei LrpA (**L**eucine-**R**esponsive **R**egulatory **P**rotein **A**) handelt es sich um einen Transkriptionsrepressor, der homolog zur bakteriellen Familie der Lrp/AsnC-Proteine ist und sein eigenes Gen (*lrpA*) autoreguliert. LrpA bindet dabei an einen Bereich stromabwärts der BRE/TATA-Box und verhindert so die Rekrutierung der RNAP.

Bezeichnung/ Referenz	Organismus	Regulation	Effektor	Regulationsmechanismus
Bat (Baliga <i>et al.</i> , 2001)	<i>Halobacterium sp.</i>	Aktivator kontrolliert Gene, die für die Synthese der Purpurmembran notwendig sind	wahrscheinlich Sauerstoff und Licht	bindet an eine UAS (U pstream A ctivator S equences)–Sequenz stromaufwärts der TATA–Box; erleichtert vermutlich die Bindung von TBP und TFB
GvpE (Bauer <i>et al.</i> , 2008)	<i>Halobacterium salinarum</i> , <i>Haloferax mediterranei</i>	Aktivator kontrolliert Gene, die an der Gasvesikel–formation beteiligt sind (<i>gvp</i> –Gencluster)	unbekannt	bindet an eine 20nt Konsensus–sequenz (UAS) unmittelbar strom–aufwärts der BRE/TATA–Box; unterstützt vermutlich die Bindung von TBP an die TATA–Box
LrpA (Brinkman <i>et al.</i> , 2000; Dahlke und Thomm, 2002)	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Repressor autoregulierte sein eigenes Gen (<i>lrpA</i>)	unbekannt	bindet stromabwärts der BRE/TATA–Box im Bereich des Transkriptionsstarts; verhindert Rekrutierung der RNAP
Lrs14 (Bell und Jackson, 2000; Napoli <i>et al.</i> , 1999)	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Repressor autoregulierte sein eigenes Gen (<i>lrs14</i>)	unbekannt	bindet im Bereich der BRE/TATA–Box; verhindert die Bindung von TBP und TFB
LysM (Brinkman <i>et al.</i> , 2002)	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Aktivator kontrolliert die Lysin–Biosynthese über den <i>lys</i> –Gencluster	Lysin	bindet stromaufwärts der BRE/TATA–Box; verändert wahrscheinlich die Struktur der Promotor–DNA und erleichtert so die Bindung von TBP und TFB
MDR1 (Bell <i>et al.</i> , 1999)	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Repressor autoregulierte sein eigenes Gen, sowie den <i>mdr1</i> –Gencluster, der für einen Metallionen–Transporter kodiert	Fe ²⁺ Mn ²⁺ Ni ²⁺	bindet an drei Operator–Elemente stromabwärts der BRE/TATA–Box im Bereich des Transkriptionsstarts; verhindert die Rekrutierung der RNAP
NrpR (Lie <i>et al.</i> , 2005)	<i>Methanococcus maripaludis</i>	Repressor kontrolliert die Stickstofffixierung über den <i>nif</i> –Gencluster	2–Oxoglutarat	bindet an zwei Operator–Elemente stromabwärts des Transkriptionsstarts; verhindert vermutlich die RNAP–Rekrutierung
Phr (Keese, 2009) Vierke <i>et al.</i> , 2003)	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Repressor autoregulierte sein eigenes Gen (<i>phr</i>); kontrolliert sechs Gene, die für Hitzeschockproteine kodieren, darunter Hsp20; kontrolliert das <i>mips</i> –Gen, sowie das Gen einer AAA ⁺ –ATPase	Temperaturen über 100°C (Hitzeschock)	bindet stromabwärts der BRE/TATA–Box im Bereich des Transkriptionsstarts; verhindert die Rekrutierung der RNAP
Ptr2 (Ouhammouch <i>et al.</i> , 2005 und 2003)	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Aktivator kontrolliert den Elektronentransfer über die Gene <i>fdxA</i> (Ferredoxin), <i>rb2</i> (Rubredoxin 2) und <i>rbr</i> (Rubrerythrin) Repressor autoregulierte sein eigenes Gen (<i>ptr2</i>)	unbekannt	bindet an eine UAS–Sequenz stromaufwärts der BRE/TATA–Box, sowie an eine weitere Bindestelle im Bereich des Transkriptionsstarts; unterstützt die Bindung von TBP bzw. verhindert die Rekrutierung der RNAP
Sta1 (Abella <i>et al.</i> , 2007 Kessler <i>et al.</i> , 2006)	<i>Sulfolobus islandicus</i>	Aktivator kontrolliert Gene des Rudivirus SIRV1; reguliert die DNA–Reparatur über das Gen <i>ss0777</i>	unbekannt	bindet an zwei bzw. drei Operatorelemente stromaufwärts, sowie unmittelbar im Bereich der BRE/TATA–Box; erleichtert vermutlich die Bindung von TBP und TFB
SurR (Lipscomb <i>et al.</i> , 2009)	<i>Pyrococcus furiosus</i>	kontrolliert den Schwefelstoffwechsel als Repressor für das Gen der Proteindisulfid–Oxidoreduktase (<i>pdo</i>) und für das Gen der NAD(P)H–abhängigen Schwefelreduktase (<i>nsr</i>) Aktivator für die Gene der Hydrogenase I (<i>mbh1</i>), der beta–Untereinheit der Hydrogenase I (<i>hydB1</i>) sowie für sein eigenes Gen (<i>surR</i>)	Schwefel	bindet promotorabhängig stromaufwärts, stromabwärts oder direkt im Bereich der BRE/TATA–Box; erleichtert vermutlich die Bindung von TBP, TFB und RNAP (Aktivierung) bzw. verhindert die Bindung von Transkriptionsfaktoren und RNAP (Repression)
Tgr (Kanai <i>et al.</i> , 2007)	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	Repressor kontrolliert Gene der Glycolyse Aktivator kontrolliert Gene der Gluconeogenese	Maltotriose	bindet an ein TGM–Motiv, das sich promotorabhängig stromaufwärts oder stromabwärts der BRE/TATA–Box befindet; erleichtert die Bindung von TBP und TFB (Aktivierung) bzw. verhindert Rekrutierung der RNAP (Repression)
TrmB (Lee <i>et al.</i> , 2003, 2005 und 2007a)	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Repressor kontrolliert die Gencluster des TM– und MD–Transporters, sowie das Gen der Phosphofructokinase (Glycolyse)	Maltose Trehalose Maltodextrine Sucrose Glucose	bindet promotorabhängig entweder im Bereich der BRE/TATA Box (TM–Promotor) oder im Bereich des Transkriptionsstarts (MD–Promotor); verhindert je nach Position der Bindestelle die Bindung von TBP und TFB bzw. die Rekrutierung der RNAP
TrmBL1 (Lee <i>et al.</i> , 2007b und 2008)	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Repressor kontrolliert Gene der Glycolyse und die Gencluster des TM– und MD–Transporters; autoregulierte sein eigenes Gen (PF0124) Aktivator kontrolliert Gene der Gluconeogenese	Maltose Maltotriose Fructose Glucose	bindet promotorabhängig entweder stromabwärts (Repression) oder stromaufwärts (Aktivierung) der BRE/TATA–Box; verhindert die Rekrutierung der RNAP (Repression) bzw. erleichtert die Bindung der Transkriptionsfaktoren (Aktivierung)
TrpY (Xie und Reeve, 2005)	<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	Repressor autoregulierte sein eigenes Gen (<i>trpY</i>); kontrolliert die Tryptophan–Biosynthese über das <i>trpEGCFBAD</i> –Operon	Tryptophan	bindet an eine TPR–Box stromabwärts bzw. direkt im Bereich der TATA–Box; verhindert die Rekrutierung von RNAP bzw. die Bindung von TBP und TFB

Tab. 1: Transkriptionsregulatoren der Archaea.

Zusammenfassung der wichtigsten, bisher charakterisierten, archaeellen Transkriptionsregulatoren und ihrer Eigenschaften.

Lrs14 ist ebenfalls homolog zur bakteriellen Lrp/AsnC-Familie und verhindert wie TrpY die Bindung der Transkriptionsfaktoren an den Promotor. MDR1 (**M**etal-**D**ependent-**R**epressor) ist homolog zum bakteriellen, metallabhängigen Regulator DtxR und hemmt die Transkription, indem es die Rekrutierung der RNAP verhindert. Effektoren für MDR1 sind verschiedene Metallionen wie Fe^{2+} , Mn^{2+} und Ni^{2+} , für TrpY wirkt Tryptophan induktisch. Beispiele für Aktivatoren in Archaeen sind u.a. LysM von *Sulfolobus solfataricus* (Brinkman *et al.*, 2002), GvpE von *Halobacterium salinarum* und *Haloferax mediterranei* (Bauer *et al.*, 2008; Krüger *et al.*, 1998), sowie Ptr2 von *Methanocaldococcus jannaschi* (Ouhammouch *et al.*, 2005 und 2003). Ptr2 (**P**utative **T**ranscription **R**egulator 2) bindet dabei stromaufwärts der BRE/TATA-Region und unterstützt die Bindung von TBP an eine schwache TATA-Box.

In *P. furiosus* sind neben LrpA bisher die Regulatorproteine Phr, SurR, TrmB und TrmBL1 näher charakterisiert worden (vgl. auch Tab. 1).

Der Hitzeschock-Regulator Phr (**P**yroccoccus **H**eat Shock **R**egulator) fungiert als Repressor der Transkription. Er autoregulierte die Transkription seines eigenen Gens (*phr*) und kontrolliert darüber hinaus sechs Gene, die in der Hitzeschockantwort eine Rolle spielen, darunter das Hitzeschockprotein Hsp20. Außerdem wird das Gen der *myo*-Inositol-1-Phosphat-Synthase (*mips*) und das Gen einer AAA^+ -ATPase von Phr negativ reguliert. Liegt kein Hitzestress vor, bindet Phr in einem Bereich stromabwärts der BRE/TATA-Box an seine Zielpromotoren und verhindert die Rekrutierung der RNAP. Bei einem Hitzeschock löst sich der Regulator von der DNA und die entsprechenden Gene werden exprimiert (Vierke *et al.*, 2003; Keese, 2009).

Ein weiterer Regulator von *P. furiosus* ist SurR (**S**ulphur **R**esponse **R**egulator), der an der Regulation des Schwefelstoffwechsels beteiligt ist und sowohl als Repressor als auch als Aktivator wirken kann. Bei Bindung an eine Region stromaufwärts der BRE/TATA-Box aktiviert er die Transkription der Gene der membrangebundenen Hydrogenase I (*mbh1*), der beta-Untereinheit der Hydrogenase I (*hydB1*) und seines eigenen Gens (*surR*), indem er die Bindung der Transkriptionsfaktoren und vermutlich auch der RNAP unterstützt. Die Gene der Proteindisulfid-Oxidoreduktase (*pdo*) und der NAD(P)H-abhängigen Schwefelreduktase (*nsr*) werden von SurR dagegen reprimiert. Hier bindet der Regulator stromabwärts bzw. direkt im Bereich der BRE/TATA-Box und verhindert so die Rekrutierung der RNAP bzw. die Bindung der Transkriptionsfaktoren. Die Bindeaffinität von SurR an die entsprechenden Zielpromotoren wird über einen Redoxschalter aus zwei Cysteinen im N-terminalen WHTH-Motiv von SurR kontrolliert. Der Redoxzustand der SH-Gruppen beeinflusst dabei die Konformation von SurR und damit seine Bindeaffinität zur Promotor-DNA. Ist kein Schwefel vorhanden, liegen die SH-Gruppen in reduziertem Zustand vor und SurR bindet an die entsprechenden Zielpromotoren. Ist Schwefel vorhanden, werden

die SH-Gruppen oxidiert und bilden eine Disulfidbrücke aus. SurR verändert daraufhin seine Konformation und löst sich von der DNA. Dies hat zur Folge, dass bei Anwesenheit von Schwefel die Expression von *mbh1* und *hydB1*, sowie von *surR* zurückgefahren wird. Die Proteindisulfid-Oxidoreduktase und Schwefelreduktase werden dagegen exprimiert, weil die SurR-vermittelte Hemmung der Transkription aufgehoben wird (Lipscomb *et al.*, 2009).

Auch Zuckertransport und -stoffwechsel werden in *P. furiosus* über spezifische Regulatorproteine kontrolliert. Die Charakterisierung der zuckerspezifischen Transkriptionsregulatoren TrmB und TrmBL1 stand im Zentrum dieser Arbeit.

3. Der Transkriptionsregulator TrmB

Wie in Kap. I, 1. bereits erwähnt, wurde ein 16kb-DNA-Fragment, welches den TM-Gencluster enthielt, durch lateralen Gentransfer von *T. litoralis* auf *P. furiosus* übertragen (DiRuggiero *et al.*, 2000). Die Induzierbarkeit des TM-Systems durch Maltose und Trehalose ging dabei jedoch nicht verloren. Das Gen, welches für das Regulatorprotein des TM-Operons kodiert, musste folglich auf demselben Genfragment lokalisiert sein. Um den Transkriptionsregulator ausfindig zu machen, wurden bisher unbekannte Gene des TM-Clusters exprimiert und in EMSA (**E**lectrophoretic **M**obility **S**hift **A**ssay)-Versuchen auf ihre Fähigkeit getestet, an den TM-Promotor zu binden. Auf diese Weise konnte das Produkt des Gens PF1743 (*trmB*) als Regulator des TM-Systems identifiziert werden (Lee *et al.*, 2003). Das Regulatorprotein wurde TrmB (**T**ranscriptional **r**egulator of the **m**altose system **B**) genannt und sein Gen (*trmB*) ist Teil des TM-Genclusters (vgl. Abb. 3A).

TrmB setzt sich aus 338 Aminosäuren zusammen und besitzt ein Molekulargewicht von 38,8 kDa. Sequenzanalysen zeigten, dass TrmB zur DUF118-Genfamilie gehört und schwache Homologien zu CymJ von *Klebsiella oxytoca*, YrhO von *Bacillus subtilis* und AF1232 von *Archaeoglobus fulgidus* aufweist. Wie das Gen *trmb* ist auch das Gen für CymJ Teil eines Genclusters, der für einen substratspezifischen ABC-Transporter (spezifisch für den Transport von Cyclodextrinen) kodiert (Pajatsch *et al.*, 1998). Eine große Homologie konnte außerdem zwischen TrmB und PF1034 von *Pyrococcus horikoshii* nachgewiesen werden.

In vitro Transkriptionsversuche mit einer TM-Promotor-Matrize und TrmB zeigten, dass es sich bei TrmB tatsächlich sowohl in *T. litoralis* als auch in *P. furiosus* um den Transkriptionsregulator des TM-Systems handelt (Lee *et al.*, 2003 und 2005). Dabei fungiert TrmB als Repressor der Transkription. Der Regulator bindet im Bereich der BRE/TATA-Box an den TM-Promotor und hemmt die Transkription, indem er die

Bindung der Transkriptionsfaktoren TBP und TFB verhindert (Abb. 7A). Ist jedoch Maltose bzw. Trehalose im Medium vorhanden, wird die TrmB-vermittelte Transkriptionshemmung aufgehoben und die Expression des TM-Systems induziert.

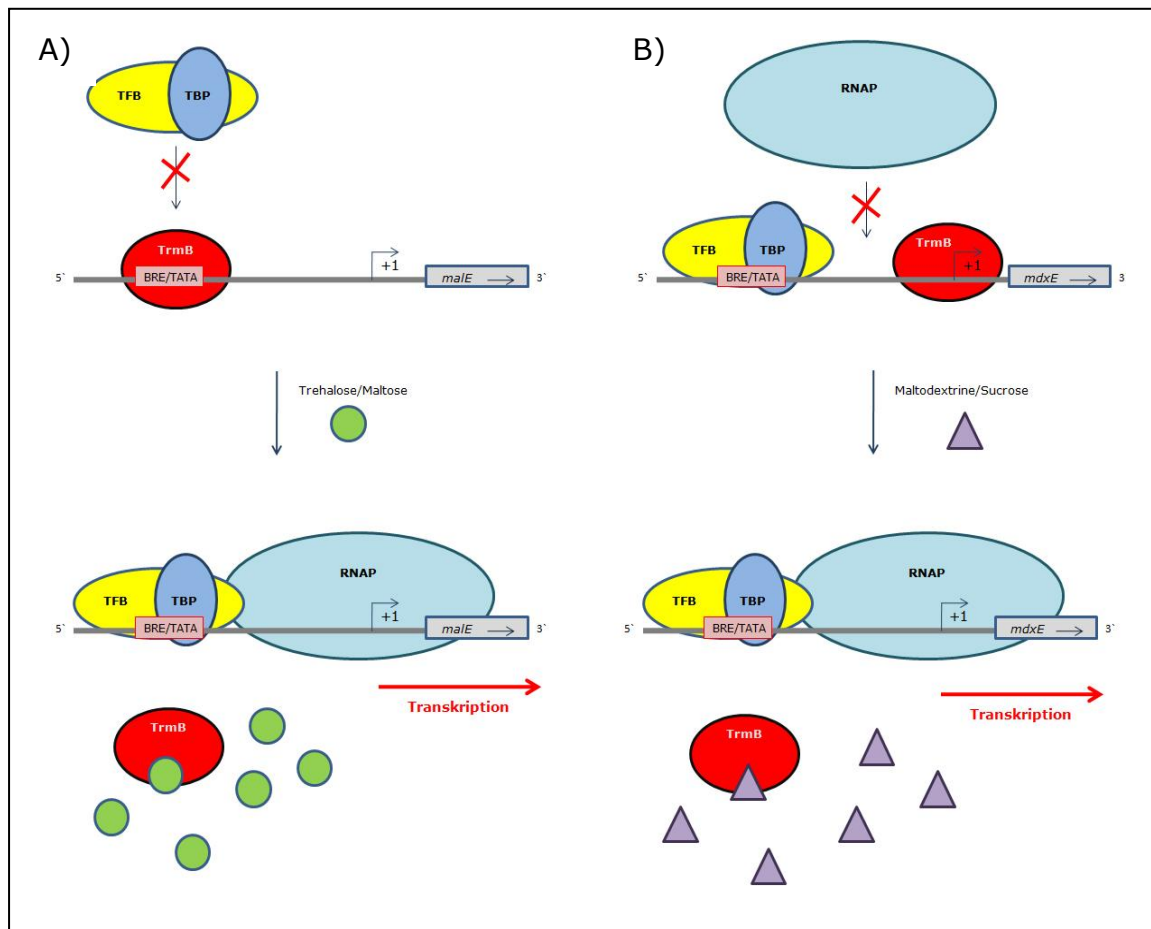


Abb.7: Transkriptionsregulation durch TrmB am TM- und MD-Promotor.

A) Regulation am TM-Promotor. TrmB bindet direkt im Bereich der BRE/TATA-Box und verhindert so die Anlagerung der Transkriptionsfaktoren TBP und TFB. Trehalose bzw. Maltose lösen TrmB von der DNA und geben den Promotor wieder für die Transkriptionsfaktoren frei.

B) Regulation am MD-Promotor. TrmB bindet stromabwärts der BRE/TATA-Box im Bereich des Transkriptionsstarts und verhindert so die Rekrutierung der RNA-Polymerase. Maltodextrine bzw. Sucrose sind hier Induktoren.

Maltose und Trehalose binden dabei an die Zucker-Bindedomäne des Regulators und verursachen eine Konformationsänderung. Diese bewirkt, dass TrmB sich von der Promotorregion löst und die BRE/TATA-Box wieder für die Transkriptionsfaktoren freigibt. Neben Maltose und Trehalose kann TrmB noch eine Reihe weiterer Zucker binden, darunter Sucrose, Glucose und Maltodextrine wie Maltotriose. Es stellte sich deshalb die Frage, ob TrmB neben dem TM-System noch andere Gene bzw. Gencluster auf Transkriptionsebene reguliert.

Die Anordnung der Gene des MD-Operons ist dem TM-Gencluster sehr ähnlich. Allerdings fehlt im MD-Operon ein Gen, das für einen Transkriptionsregulator kodiert (vgl. Abb. 3B). Da der MD-ABC-Transporter von Maltodextrinen induziert wird und sich diese Zucker auch unter den Substraten befinden, die von TrmB erkannt werden, lag die Vermutung nahe, dass TrmB auch die Expression des MD-Systems kontrollieren könnte. Dies wurde mit entsprechenden *in vitro* Transkriptionsversuchen bestätigt (Lee *et al.*, 2005). Auch hier fungiert TrmB als Repressor der Transkription. Allerdings bindet der Regulator nicht im Bereich der BRE/TATA-Box wie es beim TM-Promotor der Fall ist, sondern weiter stromabwärts im Bereich des Transkriptionsstarts. Die Transkriptionsfaktoren können hier zwar an den Promotor binden, die Rekrutierung der RNAP wird jedoch vom Regulator verhindert (Abb. 7B). Auch sind am MD-Promotor für TrmB nicht Maltose und Trehalose Induktoren, sondern Maltodextrine und Sucrose, die wiederum am TM-Promotor die TrmB-vermittelte Hemmung nicht aufheben können. TrmB besitzt also ein breites Spektrum an Zuckersubstraten und zeigt eine promotorabhängige Induktorspezifität. Dabei binden die verschiedenen Zucker mit unterschiedlicher Affinität an den Regulator. Die halbmaximale Bindung reicht dabei von 20 μM für Maltose, über 60 bzw. 250 μM für Sucrose bzw. Maltodextrine bis hin zu 500 μM für Trehalose. Maltose bindet also am besten und Trehalose am schlechtesten an TrmB. Dabei zeigt Maltose als einziges Substrat ein sigmoidales Bindeverhalten mit einem Hill-Koeffizienten von 2. Alle anderen Substrate zeigen eine hyperbolische Bindekinetik des Michaelis-Menten-Typs. Dies macht auch in physiologischer Hinsicht Sinn, da Trehalose *in vivo* in höheren Konzentrationen in der Zelle angesammelt werden kann. Maltose kommt dagegen nur in geringen Mengen vor und wird deshalb auch mit höherer Effizienz aufgenommen und verstoffwechselt (Lee *et al.*, 2003 und 2005).

Der Regulator TrmB setzt sich aus einer C-terminalen Zucker-Bindedomäne und einer N-terminalen DNA-Bindedomäne zusammen. Zur Aufklärung der Quartärstruktur von TrmB erwiesen sich herkömmliche Gelfiltrationsexperimente als ungeeignet, da der Regulator mit dem Säulenmaterial (Sephadex, Superdex, Sephacryl) interagiert. Die Chromatographie mit einer Kieselgel-Säule war jedoch erfolgreich und zeigte, dass TrmB in wässriger Pufferlösung bei Raumtemperatur als Dimer vorliegt (Lee *et al.*, 2005).

Auch die Aufklärung der Kristallstruktur des gesamten Proteins gestaltete sich zuerst schwierig, da TrmB bei höheren Proteinkonzentrationen leicht ausfällt. Aus diesem Grund wurde zunächst eine verkürzte Form von TrmB ($\Delta 2-109$) gereinigt und kristallisiert, welche nur die Zucker-Bindedomäne enthielt (Krug *et al.*, 2006). Im Gegensatz zum Gesamtprotein lag die verkürzte Variante in wässriger

Pufferlösung als Monomer vor und zeigte eine deutlich höhere Bindeaffinität für Maltose, Glucose, Sucrose und Maltotriose ($K_D=7, 25, 34$ bzw. $160 \mu\text{M}$). Die 3D-Struktur wurde bei $1,5 \text{ \AA}$ mit gebundener Maltose bestimmt. Dabei zeigte sich, dass Maltose über sieben Aminosäure-Reste gebunden wird: Ser²²⁹, Asn³⁰⁵, Gly³²⁰, Met³²¹, Val³²⁴, Ile³²⁵ und Glu³²⁶. Mit Ausnahme von Ser²²⁹ interagieren all diese Aminosäure-Reste mit dem nicht-reduzierenden α -Glycosylrest der Maltose. Dieser Glycosylrest ist in allen Substraten von TrmB vorhanden und dürfte das primäre Erkennungsmotiv darstellen.

Abb. 8 zeigt ein *Ribbon-* bzw. *Ball and Stick*-Modell der Zucker-Bindedomäne mit gebundener Maltose (Krug *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008). Die Zucker-Bindedomäne setzt sich aus einer C- und einer N-terminalen Untereinheit zusammen. Die N-terminale Untereinheit besteht aus einem achtsträngigen β -Faltblatt, das auf der einen Seite von zwei großen Helices (blau dargestellt) und auf der anderen Seite von einer großen Helix (grün dargestellt) flankiert wird. Letztere liegt quer zum β -Faltblatt und enthält den einzigen zuckerbindenden Aminosäure-Rest der N-terminalen Untereinheit, Ser²²⁹, der mit dem reduzierenden Glycosylrest der Maltose Kontakt aufnimmt. Aus diesem Grund wird sie als Zucker-Bindehelix bezeichnet. Die C-terminale Untereinheit setzt sich aus einem Strang, einer Helix und einer unregelmäßigen, abgeflachten, siebensträngigen β -*Barrel*-Struktur zusammen, deren Achse parallel zu den Strängen des Faltblatts der N-terminalen Untereinheit verläuft. Sämtliche zuckerbindende Aminosäure-Reste der C-terminalen Untereinheit befinden sich in zwei benachbarten Schleifen der β -*Barrel*-Struktur und nehmen Kontakt mit dem nicht-reduzierenden Glycosylrest der Maltose auf. Die an TrmB gebundene Maltose steckt also an der zur Oberfläche gewandten Seite der Furche zwischen N- und C-terminaler Untereinheit der Zucker-Bindedomäne. Ihre Achse ist senkrecht zur Furche orientiert. Die verborgene Oberfläche zwischen den beiden Untereinheiten ist reich an Phenylalanin und anderen hydrophoben Aminosäure-Resten, was große Bewegungen der beiden Untereinheiten bei der Substratbindung eher unwahrscheinlich macht. Dieses Modell lässt darauf schließen, dass sämtliche Zuckersubstrate von TrmB über ihre nicht-reduzierenden α -Glycosylreste an dieselben sechs Aminosäuren der C-terminalen β -*Barrel*-Struktur gebunden und fixiert werden.

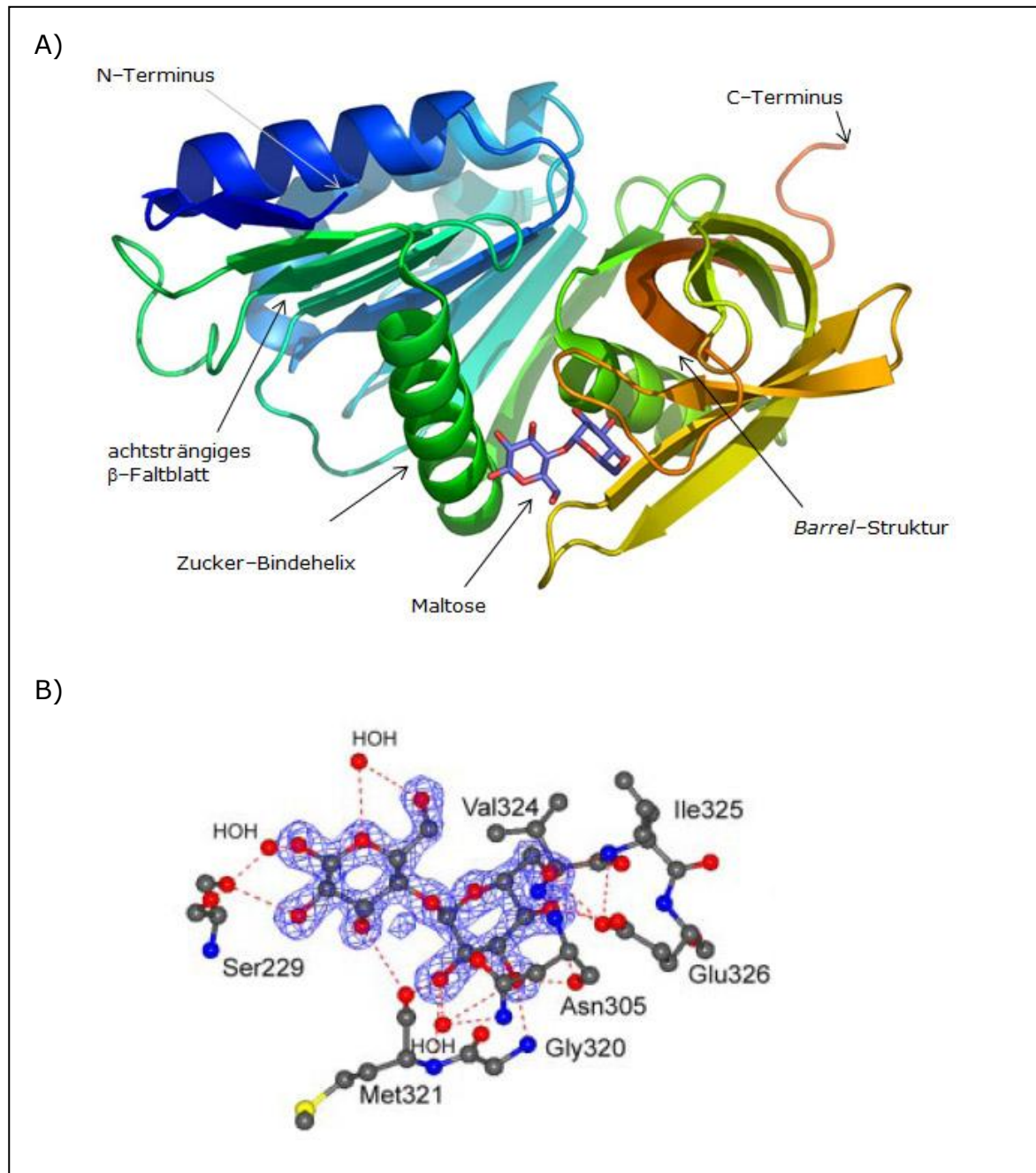


Abb.8: Kristallstruktur der Zucker-Bindedomäne von TrmB mit gebundener Maltose

A) Die Zucker-Bindedomäne (TrmB Δ_{2-109}) mit der gebundenen Maltose ist als *Ribbon*- bzw. *Ball and Stick*-Modell dargestellt. Die Maltose ist mit ihrem nicht-reduzierenden α -Glycosylrest an sechs Aminosäure-Reste der β -Barrel-Struktur der C-terminalen Untereinheit gebunden. Ser²²⁹ befindet sich in der Zucker-Bindehelix der N-terminalen Untereinheit und nimmt mit dem reduzierenden Glycosylrest der Maltose Kontakt auf.

B) Detailansicht der Maltose-Bindung von TrmB Δ_{2-109} als *Ball and Stick*-Modell. Die an der Bindung beteiligten Aminosäure-Reste sind dem wt Protein entsprechend durchnummeriert.

(nach Krug *et al.*, 2006 und Lee *et al.*, 2008).

Die Zuckerspezifität ergibt sich dann höchstwahrscheinlich aus einer unterschiedlichen Wechselwirkung der verschiedenen Zucker mit dem verbleibenden Aminosäure-Rest in der N-terminalen Zucker-Bindehelix. Dabei treten die verschiedenen Zucker vermutlich mit verschiedenen Aminosäure-Resten der Zucker-Bindehelix in Kontakt, was zu unterschiedlichen, zuckerabhängigen Bewegungen der Helix führt. Diese unterschiedliche Ausrichtung der Zucker-Bindehelix wird im vollständigen Protein wahrscheinlich auf die DNA-Bindedomäne übertragen, die sich der N-terminalen Untereinheit der Zucker-Bindedomäne unmittelbar anschließt. Dies führt zu unterschiedlichen, substratabhängigen Konformationen des Regulators, die wiederum die Promotorerkennung beeinflussen. Umgekehrt scheint die Bindung von TrmB an verschiedene Nukleotidsequenzen die Konformation der DNA-Bindedomäne zu bestimmen, die sich dann wieder auf die Zucker-Bindedomäne und -Bindehelix überträgt und so die promotorabhängige Substratspezifität des Regulators bestimmt. Mittlerweile ist es gelungen, an den MD-Promotor gebundenes TrmB zu kristallisieren und die dimere Struktur des Regulators aufzuklären (Abb. 9, W. Welte und W. Boos).

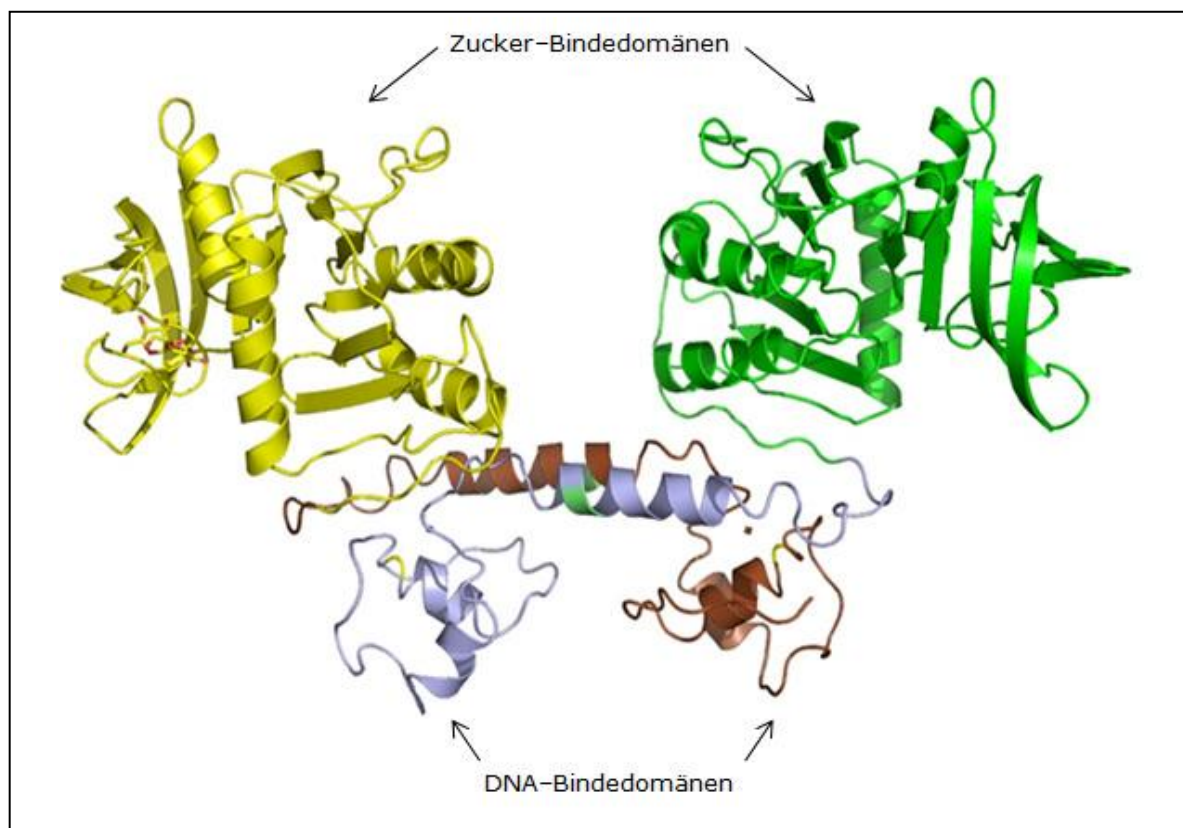


Abb.9: Dimer-Struktur von TrmB

Ribbon-Modell der dimeren Struktur von TrmB. Die Zucker-Bindedomänen sind gelb und grün, die DNA-Bindedomänen violett und braun dargestellt (W. Welte und W. Boos).

Eine nähere Betrachtung der DNA-Bindedomäne lässt vermuten, dass diese mindestens zwei potentielle **Helix-Turn-Helix** (HTH)-Strukturen und damit auch mehrere DNA-Bindemotive besitzt (vgl. Abb. 10).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob TrmB abgesehen von der Kontrolle des Zuckertransports auch an anderer Stelle regulierend in den Zuckerstoffwechsel von *P. furiosus* eingreift und dort noch weitere Zielpromotoren besitzt. Des Weiteren wurde eine Mutationsanalyse der DNA-Bindedomäne von TrmB durchgeführt um festzustellen, ob der Regulator eventuell mit verschiedenen HTH-Bereichen seiner DNA-Bindedomäne an die verschiedenen Zielpromotoren bindet.

4. Regulatoren der TrmB-Familie in *P. furiosus*

2006 wurde von van de Werken *et al.* ein konserviertes Sequenzmotiv in *P. furiosus* beschrieben, das in der Promotorregion von Genen nachgewiesen werden konnte, die für Enzyme der Glycolyse und Gluconeogenese (vgl. Abb. 5) kodieren. Dieses Sequenzmotiv wurde als ***Thermococcales Glycolytic Motif*** (TGM) bezeichnet und legt eine gemeinsame Regulation der betroffenen Gene auf Transkriptionsebene nahe. Das TGM-Motiv besteht aus der palindromischen Konsensus-Sequenz „TATCAC-N₅-GTGATA“ und ist abgesehen von *P. furiosus* in keiner weiteren *Pyrococcus*-Art zu finden. Es konnte aber im Archaeon *Thermococcus kodakaraensis* ebenfalls nachgewiesen werden. Da der Regulator TrmB in *T. kodakaraensis* jedoch nicht vorkommt, musste es noch einen weiteren, globalen Transkriptionsregulator geben, der das TGM-Motiv erkennt und für die Regulation der betroffenen Gene verantwortlich ist. Um diesen Regulator zu identifizieren, wurde im Genom von *P. furiosus* und *T. kodakaraensis* sowie weiteren Vertretern der Ordnung *Thermococcales* nach TrmB-ähnlichen Proteinen gesucht. Dabei konnten in *P. furiosus* neben TrmB noch drei weitere TrmB-homologe Proteine identifiziert werden, welche die Bezeichnung TrmBL1 (***TrmB-Like 1***), TrmBL2 und TrmBL3 erhielten. Auch in allen anderen untersuchten Spezies der *Thermococcales* konnten TrmB-orthologe Proteine nachgewiesen werden (Tab. 2). Jüngste Untersuchungen belegten außerdem, dass Regulatoren der TrmB-Familie nicht nur in Organismen der *Thermococcales* vorkommen. So konnte 2009 von Schmid *et al.* auch in *Halobacterium salinarium* ein TrmB-homologes Regulatorprotein nachgewiesen werden, dass an der Transkriptionsregulation zahlreicher Stoffwechselenzyme beteiligt ist. Vertreter der TrmB-Familie scheinen demnach weiter innerhalb der Archaeen verbreitet zu sein als zunächst angenommen.

	TrmB	TrmBL1	TrmBL2	TrmBL3	TrmBL4
<i>Pyrococcus furiosus</i>	PF1743	PF0124	PF0496	PF0661	-
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	PH1034 (71%)	-	PH0799 (92%)	-	PH0751
<i>Pyrococcus abyssi</i>	-	-	PAB0838 (91%)	-	-
<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	-	TK1769 (67%)	TK0471 (82%)	-	-

Tab. 2: Verbreitung von Proteinen der TrmB-Familie innerhalb der *Thermococcales*.

Die Prozentangaben in Klammern zeigen die Höhe der Aminosäure-Sequenzidentität im Vergleich mit dem entsprechenden Protein aus *P. furiosus*. Das Minuszeichen gibt an, dass im Genom des betroffenen Organismus kein entsprechendes Protein nachgewiesen werden konnte. (nach Lee *et al.*, 2007b)

Allerdings gibt es nicht in allen untersuchten Organismen der *Thermococcales* sämtliche Vertreter der TrmB-Familie. TrmBL1 und TrmBL2 waren potentielle Kandidaten für das postulierte, globale Regulatorprotein mit dem TGM-Motiv als Erkennungssequenz für die Promotorbindung, da Orthologe beider Proteine sowohl in *P. furiosus* als auch in *T. kodakaraensis* vorkommen. Ein Aminosäuresequenzvergleich (Abb. 10) zeigte jedoch, dass bei TrmBL2 (PF0496) aus *P. furiosus* die C-terminale Zucker-Bindedomäne fehlt. Aus diesem Grund verblieb nur noch TrmBL1 als Kandidat für die globale Regulation des Zuckerstoffwechsels in *P. furiosus*. TrmBL1 besteht aus 341 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 39,4 kDa. Zwischen TrmBL1 (PF0124) aus *P. furiosus* und dem TrmBL1-orthologen Protein Tgr (TK1769) aus *T. kodakaraensis* besteht 67% Sequenzidentität. In *T. kodakaraensis* bindet Tgr an das TGM-Motiv und fungiert promotorabhängig sowohl als Repressor als auch als Aktivator. So reprimiert er die Transkription glycolytischer Gene, während er auf die Expression gluconeogenetischer Gene stimulierend wirkt (Kanai *et al.*, 2007).

Ein Ziel dieser Arbeit war es nun zu untersuchen, ob TrmBL1 an die Promotoren glycolytischer und gluconeogenetischer Gene in *P. furiosus* bindet und ob TrmBL1 an der Transkriptionskontrolle dieser Gene beteiligt ist. Im Zentrum dieser Untersuchungen standen dabei der Promotor des glycolytischen Enzyms Phosphofructokinase (PF1784) bzw. der Promotor des gluconeogenetischen Enzyms Fructose-1,6-Bisphosphatase (PF0613). Im *P. furiosus*-Genom befinden sich beide Gene mit einem Abstand von 1,5 (PF1784) bzw. 0,5 Mbp (PF0613) relativ weit vom TrmBL1-Gen (PF0124) entfernt.

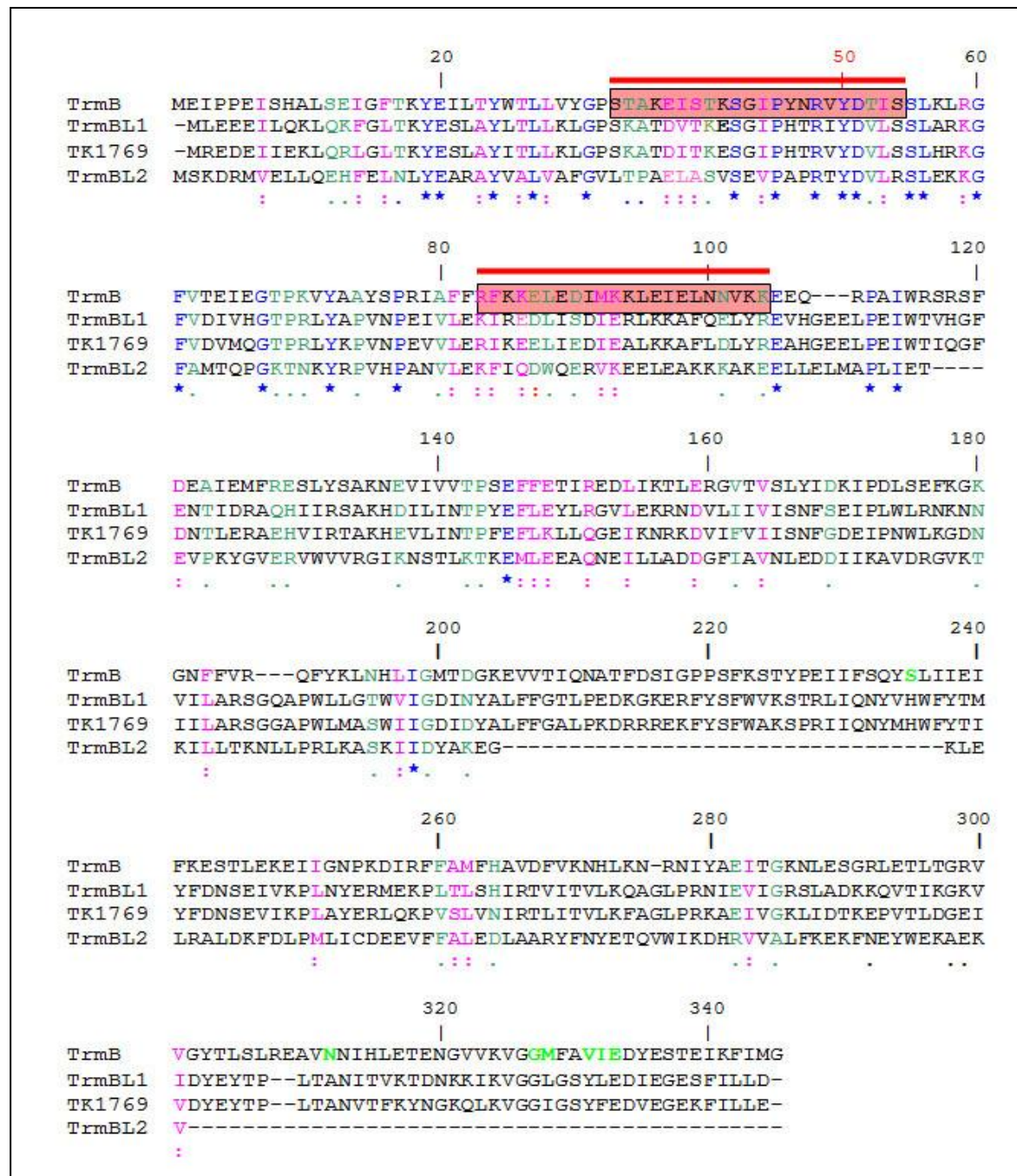


Abb.10: Aminosäure-Sequenzvergleich von Vertretern der TrmB-Familie.

Gezeigt ist ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von TrmB (PF1743) mit TrmBL1 (PF0124) und TrmBL2 (PF0496) aus *Pyrococcus furiosus*, sowie mit dem TrmBL1-Paralog Tgr (TK1769) aus *Thermococcus kodakaraensis*. Die Positionen potentieller Helix-Turn-Helix-Motive in der N-terminalen DNA-Bindedomäne von TrmB sind mit einem roten Kasten markiert. Streng konservierte Aminosäuren sind mit einem Sternchen markiert und blau hervorgehoben. Stark konservierte Aminosäuren sind rosa und mit einem Doppelpunkt gekennzeichnet und schwach konservierte Aminosäure sind dunkelgrün dargestellt und mit einem Punkt markiert. Aminosäuren der C-terminalen Zucker-Bindedomäne von TrmB, die bei der Bindung von Maltose eine entscheidende Rolle spielen, sind hellgrün hervorgehoben. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW erstellt.

Ferner wurde auch für TrmBL1 eine Mutationsanalyse der DNA-Bindedomäne durchgeführt, um das Bindevverhalten des Regulators bestimmen zu können und festzustellen, ob auch TrmBL1 eventuell mehrere DNA-Erkennungshelices besitzt. Auch zwischen TrmB und TrmBL1 aus *P. furiosus* besteht über die Gesamtlänge der Proteine eine Aminosäure-Sequenzidentität von 29%. Betrachtet man nur die N-terminale DNA-Bindedomäne beträgt sie sogar 45%. Dies ließ vermuten, dass sich TrmB und TrmBL1 eventuell einige Zielpromotoren teilen könnten, was im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurde. TrmBL1 besitzt jedoch im Vergleich zu TrmB nur zwei der sieben zuckerbindenden Aminosäuren, Gly³²⁰ und Glu³²⁶, was auf eine unterschiedliche Zuckerspezifität hinweist (Lee *et al.*, 2007b).

Diese Arbeit beschäftigt sich also mit der Charakterisierung und Wirkungsweise der Transkriptionsregulatoren TrmB und TrmBL1 und soll ihre Funktion in der Regulation des Zuckertransports sowie des Zuckerstoffwechsels in *P. furiosus* näher untersuchen.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien

Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Serva Heidelberg
APS	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit (USA)
Bacto Trypton	Difco, Detroit (USA)
BlueSlick	Serva, Heidelberg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Complete Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G250	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Sigma, Taufkirchen
1,4 Dithiothreitol	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
EDTA-Na ₂ (Titrplex III)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Baker B.V
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Merck, Darmstadt
GeneRuler™ 1kB Ladder	MBI Fermentas
GeneRuler™ 100bp Ladder	MBI Fermentas
Glucose	Merck, Glucose
Glycerin (87%)	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
Imagine Plate (BAS-IP MS 2025, 20x25cm)	Fuji, Tokio (Japan)
Imagine Plate (BAS-IP MS 2040, 20x40cm)	Fuji, Tokio (Japan)
Imidazol	Sigma, St. Louis (USA)
IPTG	Roth, Karlsruhe

Isotop [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP	Hartmann Analytics, Braunschweig
Isotop [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP	Hartmann Analytics, Braunschweig
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumglutamat	Sigma, St. Louis (USA)
Ligation Buffer (10x)	Roche, Mannheim
Loading Dye (6x) für DNA Ladder Mix	MBI Fermentas
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Maltose	Merck, Darmstadt
Maltotriose	Aldrich, Taufkirchen
Manganchlorid-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MOPS	Sigma, Taufkirchen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	VWR, Haasrode (Belgien)
NEBuffer 2 (10x)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
NTPs	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
Oligonukleotide	MWG, Ebersberg und Eurogentec, Köln
PageRuler Unstained Protein Ladder	MBI Fermentas
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure (87%)	Merck, Darmstadt
PMSF	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol (PEG) 8000	Sigma, Taufkirchen
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
(Acrylamid : Bisacrylamid 30 : 0,8)	
Rubidiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
Streptavidin Magnetic Particles	Roche, Mannheim
Sucrose	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
TRIS	USB, Cleveland (USA)
Unstained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, Wilna (Litauen)
Whatman-Papier	3MM, Maidstone (Großbritannien)
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

Der Reinheitsgrad der verwendeten Chemikalien war in der Regel p.A.

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

1.2. Nährmedien

1.2.1. Luria–Bertani (LB₀)-Medium, pH 7,5

Bacto Trypton	10 g
Bacto Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ad 1000 ml mit H ₂ O _{bidest}	

1.2.2. LB–Agar (1,8%), pH 7,5

Bacto Trypton	10 g
Bacto Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	18 g
ad 1000 ml mit H ₂ O _{bidest}	

1.3. Puffer und Lösungen

1.3.1. Puffer und Lösungen für die Präparation von Proteinen

Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 (0,5 M)

Na ₂ HPO ₄	72,0 g
NaH ₂ PO ₄	13,1 g
ad 1000 ml mit H ₂ O _{bidest}	

Waschpuffer, pH 7,5

Natriumphosphatpuffer, pH 7,5	50 mM
NaCl	500 mM
Hepes	40 mM
Glucose	5 mM
Imidazol	50 mM
Glycerin	15 % (v/v)

Elutionspuffer, pH 7,5

Natriumphosphatpuffer, pH 7,5	50 mM
NaCl	500 mM
Hepes	40 mM
Glucose	5 mM
Imidazol	500 mM
Glycerin	15 % (v/v)

Coomassie Brilliant Blue Solution für Bradford-Test, 5x

Coomassie Brilliant Blue G250	100 mg
Methanol	50 ml
Phosphorsäure (85%)	100 ml
ad 200 ml mit H ₂ O _{bidest}	

1.3.2. Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamid-GelelektrophoresenPuffer für Trenngel, pH 8,8

Tris/HCl (auf pH 8,8 einstellen)	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

Puffer für Sammelgel, pH 6,8

Tris/HCl (auf pH 6,8 einstellen)	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

Trenngel, 12%ig

H ₂ O _{bidest}	2,7 ml
Rotiphoese Gel 30	3 ml
Puffer für Trenngel, pH 8,8	1,9 ml
APS (10%)	25 µl
TEMED	5 µl

Sammelgel, 4%ig

H ₂ O _{bidest}	2,4 ml
Rotiphoese Gel 30	0,5 ml
Puffer für Sammelgel, pH 6,8	1 ml
APS (10%)	25 µl
TEMED	4 µl

Auftragspuffer nach LÄMMLI, 5x

Tris/HCl, pH 6,8	250 mM
SDS	5 % (w/v)
DTT	250 mM
Saccharose	50 % (w/v)
Bromphenolblau	0,5 % (w/v)

SDS-Elektrophorese-Puffer, 5x

Tris	125 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,5 % (w/v)

Färbelösung

Essigsäure (10%)	100 ml
Coomassie Brilliant Blue R250	0,1 % (w/v)
ad 1000 ml mit H ₂ O _{bidest}	

1.3.3. Puffer und Lösungen für die Reinigung der RNA-PolymeraseZellaufschlusspuffer, pH 8

Tris/HCl, pH 8	50 mM
MgCl ₂	10 mM
KCl	50 mM
Glycerin	40% (v/v)
PMSF	1 mM
β-Mercaptoethanol	5 mM
Complete Protease Inhibitor	½ Tabl./l

Biorex-Puffer +100 bzw. +1000, pH 7,8 (für Biorex-Säule)

K-Hepes, pH 7,8	40 mM
MgCl ₂	2,5 mM
KCl	100 bzw. 1000 mM
EDTA	1 mM
Glycerin	20% (v/v)
PMSF	1 mM
β-Mercaptoethanol	5 mM
Complete Protease Inhibitor	½ Tabl./l

TMK-Puffer +100 bzw. +800, pH 7,5 (für Heparin-Säule)

Tris/HCl	50 mM
MgCl ₂	2,5 mM
KCl	100 bzw. 800 mM
Glycerin	20% (v/v)
PMSF	1 mM
β-Mercaptoethanol	5 mM
Complete Protease Inhibitor	½ Tabl./l

TMK-Puffer +250 bzw. +800, pH 7,0 (für MonoQ-Säule)

Tris/HCl	50 mM
MgCl ₂	2,5 mM
KCl	250 bzw. 800 mM
Glycerin	20% (v/v)
PMSF	1 mM
β-Mercaptoethanol	5 mM
Complete Protease Inhibitor	½ Tabl./l

Salzmix (2x) für TCA-Test

Hepes (pH 7,3)	80 mM
MgCl ₂	10 mM
KCl	250 mM
EDTA	0,2 mM

TP-Mix für TCA-Test

ATP	10 mM
UTP	1 mM

Fertigmix für TCA-Test

TP-Mix	2 ml
Poly [dAT] (0,25 mg/ml)	2 ml
Salzmix (2x)	10 ml
H ₂ O _{bidest}	6 ml

Stop-Mix für TCA-Test

NaCl	160 mM
Trichloracetat	5,5% (v/v)

1.3.4. Puffer und Lösungen für Agarose-Gele

TBE-Puffer, 10x

Tris	900 mM
Borsäure	900 mM
EDTA	20 mM

Agarose-Gel, 1,5%

Agarose	0,45 % (w/v)
1x TBE-Puffer	30 ml
Ethidiumbromid (10 µg/ml-Lösung)	1,5 µl

Auftragspuffer, 6x

Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
Saccharose	50 % (w/v)
Harnstoff	4 M
EDTA	50 mM

1.3.5. Puffer und Lösungen für *in vitro* Transkription

PA-Harnstoff-Gellösung, 7%

Harnstoff	7 M
TBE, 10x (siehe Kap. II, 1.3.4.)	100 ml
Rotiphorese Gel 30	234 ml
ad 1000 ml mit H ₂ O _{bidest}	

PA-Harnstoff-Gellösung, 10%

Harnstoff	7 M
TBE, 10x (siehe Kap. II, 1.3.4.)	50 ml
Rotiphorese Gel 30	167 ml
ad 500 ml mit H ₂ O _{bidest}	

PA-Harnstoff Gel, 7% bzw. 10%

PA-Harnstoff-Gellösung (7% bzw. 10%)	30 ml
APS (10%)	200 µl
TEMED	20 µl

Transkriptionspuffer I

NaHepes, pH 7,3	32 mM
EDTA	0,08 mM
KCl	250 mM
MgCl ₂	4 mM

Transkriptionspuffer II

NaHepes, pH 7,3	40 mM
NaCl	250 mM
EDTA	0,1 mM
MgCl ₂	2,5 mM
β-Mercaptoethanol	5 mM
BSA	0,1 mg/ml

Transkriptionspuffer III

NaHepes, pH 7,3	40 mM
Kaliumglutamat	600 mM
EDTA	0,1 mM
MgCl ₂	2,5 mM
BSA	0,1 mg/ml

Auftragungspuffer, 3x

Formamid	98 % (v/v)
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
Xylencyanol	0,1 % (w/v)
EDTA, pH 8,0	10 mM

NTP-Mix

ATP	11 mM
CTP	11 mM
GTP	11 mM
UTP	0,67 mM

1.3.6. Puffer für die Immobilisierung von DNA mit Streptavidin Magnetic Particles

Waschpuffer A

Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	100 mM

Bindepuffer B

Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
EDTA	1 mM
NaCl	100 mM

Waschpuffer C

Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	1 M

TE-Puffer (10:0,1)

Tris/HCl, pH 8	10 mM
EDTA	0,1 mM

1.3.7. Puffer und Lösungen für EMSA

PA-Gel, 6%

H ₂ O _{bidest}	20 ml
TBE, 10x (siehe Kap. II, 1.3.4.)	3 ml
Rotiphorese Gel 30	6 ml
Glycerin	0,6 ml
APS (10%)	0,3 ml
TEMED	30 µl

EMSA-Puffer

NaHepes, pH 7,3	25 mM
EDTA	0,1 mM
Kaliumglutamat	120 mM
MgCl ₂	2,5 mM
DTT	1 mM
BSA	0,1 mg/ml
PEG 8000	5 % (v/v)

1.3.8. Puffer und Lösungen für DNaseI-FootprintingPA-Harnstoff-Gel, 7%

PA-Harnstoff-Gellösung, 7% (siehe Kap. II, 1.3.5.)	50 ml
APS (10%)	334 µl
TEMED	34 µl

DNaseI-Footprinting-Puffer I

NaHepes, pH 7,3	40 mM
EDTA	0,1 mM
NaCl	250 mM
PEG 8000	5 % (v/v)
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	2,5 mM

DNaseI-Footprinting-Puffer II

NaHepes, pH 7,3	25 mM
EDTA	0,1 mM
Kaliumglutamat	120 mM
MgCl ₂	2,5 mM
DTT	1 mM
PEG 8000	5 % (v/v)
CaCl ₂	2 mM
BSA	0,1 mg/ml

1.3.9. Sonstige Lösungen

Maltose	500 mM
Maltotriose	500 mM
Trehalose	500 mM
Glucose	500 mM
Sucrose	500 mM
Fructose	500 mM
Ampicillin	100 mg/ml
IPTG	400 mM

1.4. Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> , Stamm C43(DE3)	Mutante des Stammes BL21(DE3) (Miroux & Walker, 1996)
<i>Escherichia coli</i> , Stamm DHL5 α	
<i>Escherichia coli</i> , Stamm JM109	(Stratagene, La Jolla, USA)
<i>Escherichia coli</i> , Stamm SF120	(Lee <i>et al.</i> , 2003)
<i>Pyrococcus furiosus</i> , Stamm VC1	(Fiala und Stetter, 1986)
<i>Escherichia coli</i> , Stamm BL21 DE3 plysS	

1.5. Plasmide

pUC19	2686 bp, lacZ α , Amp ^R ; (Roche, Mannheim)
pMLP	pUC19 mit dem EcoRI–BamHI Fragment des TM–Promotors und Anfangsbereich von <i>malE</i> (PF1739) ; (Lee <i>et al.</i> , 2003)

pSL152	pCS19 (3431 bp, T5 Promotor/lac Operator-element; T5 Transkriptionsstart, <i>laq^q</i>) mit <i>trmb</i> (PF1743), C-terminaler His ₆ -tag ; (Lee <i>et al.</i> , 2003)
pCS19/PF0124	pCS19 mit <i>trmb1</i> (PF0124), C-terminaler His ₆ -tag; (Lee <i>et al.</i> , 2007)
pSL195	pUC19 mit EcoRI–HindIII Fragment des MD-Promotors und Anfangsbereich von <i>mdxE</i> (PF0496); (Lee <i>et al.</i> , 2005)
pUC19/PF0124	pUC19 mit Promotor- und Anfangsbereich des PF0124–Gens; (Lee <i>et al.</i> , 2007)
pUC19/PF1784	pUC19 mit Promotor- und Anfangsbereich des PF1784–Gens; (Lee <i>et al.</i> , 2007)
pUC19/PF0613	pUC19 mit Promotor- und Anfangsbereich des PF0613–Gens; (Lee <i>et al.</i> , 2008)

1.6. Enzyme und andere Proteine

BSA (10 mg/ml)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
DNaseI	Roche, Mannheim
Phusion–DNA–Polymerase (2 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
T4–Ligase (1 U/μl)	Roche, Mannheim
T4–Polynukleotid–Kinase (10 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.

Restriktionsendonukleasen

EcoRI (20 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
BamHI (20 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
HindIII (20 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.

Lagerung aller aufgeführten Enzyme und Proteine bei -20 °C

RNA-Polymerase, Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsregulatoren

Die Transkriptionsfaktoren TBP und TFB von *Pyrococcus furiosus* lagen bereits gereinigt im Labor vor (Hethke *et al.*, 1996). Die RNA-Polymerase sowie die Transkriptionsregulatoren TrmB und TrmBL1 wurden während der Arbeit säulenchromatographisch gereinigt (siehe Kap. II, 2.1. und 2.3.). Die Lagerung von Transkriptionsfaktoren und -regulatoren erfolgte bei -20°C, die der RNA-Polymerase bei -80°C.

1.7. Kits

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR-Purification Kit	Quiagen, Hilden
QIAprep spin Miniprep Kit	Quiagen, Hilden
QuikChange II Site-Direkted Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit	USB, Cleveland, USA

1.8. Oligonukleotide

5PF1784, 25-mer	5` -TTC AGC ATT CAG GTT TAC GAT AGC A- 3`
3PF1784, 26-mer	5` -ATC TGC TGG AAG TAT CCT TCT TAC CT- 3`
M13/pUC F, 22-mer	5` -GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A- 3`
M13/pUC R, 24-mer	5` -GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG- 3`
MDTA_1_F, 40-mer	5` -GCC TTA AAA CAA AAA TCA CTA TCG ATG ATA CTA ACA TGG G- 3`
MDTA_1_R, 40-mer	5` -CCC ATG TTA GTA TCA TCG ATA GTG ATT TTT GTT TTA AGG C- 3`
MDTA_2_F, 40-mer	5` -GCC TTA AAA CAA AAT ATA TTA TCG ATG ATA CTA ACA TGG G- 3`
MDTA_2_R, 40-mer	5` -CCC ATG TTA GTA TCA TCG ATA ATA TAT TTT GTT TTA AGG C- 3`
MDTA_3_F, 40-mer	5` -GCC TTA AAA CAA AAT ATA TAT ACT ATG ATA CTA ACA TGG G- 3`
MDTA_3_R, 40-mer	5` -CCC ATG TTA GTA TCA TAG TAT ATA TAT TTT GTT TTA AGG C- 3`
MDTA_4_F, 31-mer	5` -CAA AAT ATA TAT ACT TTT AGA CTA ACA TGG G- 3`
MDTA_4_R, 31-mer	5` -CCC ATG TTA GTC TAA AAG TAT ATA TAT TTT G- 3`
MDTA_5_F, 34-mer	5` -CAA AAT ATA TAT ACT TTT AGT ATA ACA TGG GAG G- 3`

MDTA_5_R, 34-mer	5`-CCT CCC ATG TTA TAC TAA AAG TAT ATA TAT TTT G- 3`
MDTA_6_F, 23-mer	5`-CTT TTA GTA TAT ACA GGG AGG TG -3`
MDTA_6_R, 23-mer	5`-CAC CTC CCT GTA TAT ACT AAA AG -3`
PF0613AF, 27-mer	5`-CCT TAA CAT TTC TCC AAA ATA TTT CGG -3`
PF0613AR, 30-mer	5`-CCC TTC TTG TGA GTC ATT ATA AGC TGG AGG- 3`
PF0613BamF, 23-mer	5`-GGG TCG GAT CCT TAA CAT TTC TC- 3`
PF0613EcoRI, 29-mer	5`-GGA ATT CCG GAA TGT AAC TAT TGG TTC GC -3`
PF0613BF, 28-mer	5`-CGA CAA TAT AAT CTC ACA AAG ATA AAA G- 3`
PF0613BR, 25-mer	5`-GGT CCT GTC CAG CTC CAT ATA GGC C- 3`
pQE F, 22-mer	5`-GTA TCA CGA GGC CCT TTC GTC T- 3`
pQE R, 24-mer	5`-CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG GAG- 3`
TMMDshort F, 23-mer	5`-CTA AAA ACA AAC CAA GCA GTA CC -3`
TMMDshort R, 24-mer	5`-GCC ACT ACT CCA AGA ACT AAA ATG- 3`
TrmB87Asn F, 55-mer	5`-CTC ACC AAG AAT AGC ATT TTT CAG GTT CAA AAA AAA CCT CGA AGA CAT AAT GAA A- 3`
TrmB87Asn R, 55-mer	5`-TTT CAT TAT GTC TTC GAG GTT TTT TTT GAA CCT GAA AAA TGC TAT TCT TGG TGA G- 3`
TrmBE87Gly F, 50-mer	5`-AAT AGC ATT TTT CAG GTT CAA AAA AGG ACT CGA AGA CAT AAT GAA AAA GC- 3`
TrmBE87Gly R, 50-mer	5`-GCT TTT TCA TTA TGT CTT CGA GTC CTT TTT TGA ACC TGA AAA ATG CTA TT- 3`

2. Methoden

2.1. Reinigung der Transkriptionsregulatoren (TrmB, TrmBL1 und Mutanten)

2.1.1. Expression

Das Plasmid pSL152 mit dem TrmB-Gen PF1743 und einem C-terminalen His₆-tag (Lee *et al.*, 2003) lag zu Beginn der Arbeit bereits als fertiges Konstrukt vor. Die Expression erfolgte im *E. coli*-Expressionsstamm C43/DE2 „Walker“. Das TrmBL1-Gen PF0124 aus *P. furiosus* mit einem C-terminalen His₆-tag im Plasmid pCS19 (Lee *et al.*, 2007) stand ebenfalls bereits zur Verfügung. Die Expression fand im *E. coli*-Expressionsstamm SF120 statt. Der Codon-Gebrauch unterscheidet sich von Organismus zu Organismus. Zur Expression rekombinanter Proteine aus *P. furiosus* kamen deshalb *E. coli*-Stämme zum Einsatz, die über Extrakopien von tRNA-Genen für seltene Codons verfügten.

Für die Expression der Transkriptionsregulatoren TrmB und TrmBL1 wurden zuerst Vorkulturen angelegt. Dafür wurden 30 ml autoklaviertes LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (Endkonzentration) versetzt, mit der entsprechenden Glycerinkultur beimpft (C43/DE2 „Walker“/pSL152 bzw. SF120/pCS19/PF0124) und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden vier 2 l -Erlenmeyerkolben mit je 400 ml autoklaviertem LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin (Endkonzentration) mit je 6 ml der Vorkultur beimpft. Die Kolben wurden anschließend unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Das Wachstum wurde dabei in regelmäßigen Abständen durch Messen der Optischen Dichte (OD) bei 600 nm mit dem Photometer (Beckman DU 640) überprüft. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4–0,6 wurde die Expression mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Ohne IPTG (**I**sopropyl-β-D-**t**hiogalactopyranosid) ist der dem Zielgen vorgeschaltete T5-Promotor des Plasmids durch den Lac-Repressor verschlossen. Durch Zugabe von IPTG während der Phase des exponentiellen Wachstums wird der Promotor aktiviert. Die T5 RNA-Polymerase transkribiert dann das Zielgen und das gewünschte Protein wird exprimiert.

Nach Zugabe von IPTG erfolgten weitere 4 Stunden Inkubation bei 37°C. Um die Expression des Regulatorproteins verfolgen zu können, wurden unmittelbar vor der Induktion und stündlich nach der Induktion je 1 ml Zellkultur entnommen und in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415 C) pelletiert (10 min bei 11000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl H₂O_{bidest} resuspendiert. Davon wurde je 1 µl mit 19 µl H₂O_{bidest} und 5 µl Lämmli-

Auftragspuffer (5x) versetzt und einer SDS-PAGE (siehe Kap. II, 2.2.) unterzogen (Abb. 11A). 4 Stunden nach der Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation abgeerntet (6000 rpm für 20 min; Beckman Centrifuge Avanti J25, Rotor JA-10). Der Überstand wurde dekantiert, und das Zellpellet wurde bis zur Weiterverarbeitung durch Zellaufschluss bei -20°C gelagert.

2.1.2. Zellaufschluss und Hitzefällung

Die nach der Expression gewonnenen Zellpellets (siehe Kap. II, 2.1.1.) wurden zusammengeführt und in 10 ml Waschpuffer resuspendiert. Da insbesondere TrmB während der Präparation und bei längerer Lagerung leicht denaturiert, enthielten Wasch- und Elutionspuffer 15% Glycerin und 5 mM Glucose zur Stabilisierung des Regulatorproteins.

Die Zellsuspension wurde dann 3x mit einer French Press Zelle (SLM Instruments, Inc., Urbana, USA) bei 1200 p.s.i. aufgeschlossen. Um die löslichen Bestandteile von den Zellfragmenten zu trennen, wurde das Lysat 30 Minuten bei 20000 rpm zentrifugiert (Beckman Centrifuge Avanti J25, Rotor JA-25.50). Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde in ein frisches Gefäß überführt. Das Pellet wurde verworfen.

Um den Großteil der *E. coli*-Proteine aus dem Überstand zu entfernen, wurde dieser einem Hitzeschritt im Wasserbad unterzogen (10 min bei 80°C). Dabei denaturierten die *E. coli*-Proteine und fielen in weißen Flocken aus, während das thermostabile Regulatorprotein aus *P. furiosus* stabil in Lösung blieb. Zur Entfernung der präzipitierten *E. coli*-Proteine folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 20000 rpm für 30 Minuten (Beckman Centrifuge Avanti J25, Rotor JA-25.50). Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt.

Zum Nachweis des gewünschten Proteins nach Zellaufschluss und Hitzefällung wurden je 2 µl des Überstands mit 18 µl H₂O_{bidest} und 5 µl Lämmli-Auftragspuffer (5x) versetzt und mittels SDS-PAGE (siehe Kap. II, 2.2.) analysiert.

2.1.3. Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Zur weiteren Aufreinigung des Regulatorproteins wurde der Überstand nach dem Hitzeschritt einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie unterzogen.

Hierbei handelt es sich um eine selektive Trennungsmethode, die auf der Interaktion zweier Reaktionspartner beruht. Ni²⁺-Ionen sind durch Nitrilotriessigsäure-Reste an die Säulenmatrix gebunden und reagieren mit dem His₆-tag des zu reinigenden

Proteins. Dieses wird so aus der Lösung entfernt und verbleibt in der Matrix. Das Protein kann dann mit einem Puffer, der eine hohe Konzentration an Imidazol enthält, wieder eluiert werden. Imidazol konkurriert mit dem Protein um die Bindung an die Ni^{2+} -Ionen der Matrix, wodurch das Protein wieder freigesetzt wird.

Zur Aufreinigung der Regulatorproteine wurde eine Chromatographie-Säule (Sigma, Taufkirchen) mit 2 ml Ni-NTA-Agarose befüllt. Nachdem sich das Säulenmaterial gesetzt hatte, wurde die Säule mit 40 ml Waschpuffer äquilibriert. Anschließend wurde das hitzegefällte Rohextrakt aufgetragen. Es folgten vier Waschschrte mit je 5 ml Waschpuffer, um ungebundenes Protein zu entfernen. Von Durchlauf und Waschschrten wurden je 5 μl mit 15 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und 5 μl Lämmli-Auftragspuffer (5x) versetzt und einer SDS-PAGE (siehe Kap. II, 2.2.) unterzogen. Um das Protein von der Säulenmatrix zu lösen, wurden 7 ml Elutionspuffer aufgetragen. Das Eluat wurde in sieben Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen. Fraktionen, die gereinigtes TrmB bzw. TrmBL1 enthielten, wurden mittels einer 12%igen SDS-PAGE ermittelt. Dabei zeigte sich auf dem Gel im Vergleich mit dem Standard bei TrmB eine Bande von 38,8 kDa und bei TrmBL1 eine Bande von 39,4 kDa (Abb. 11B).

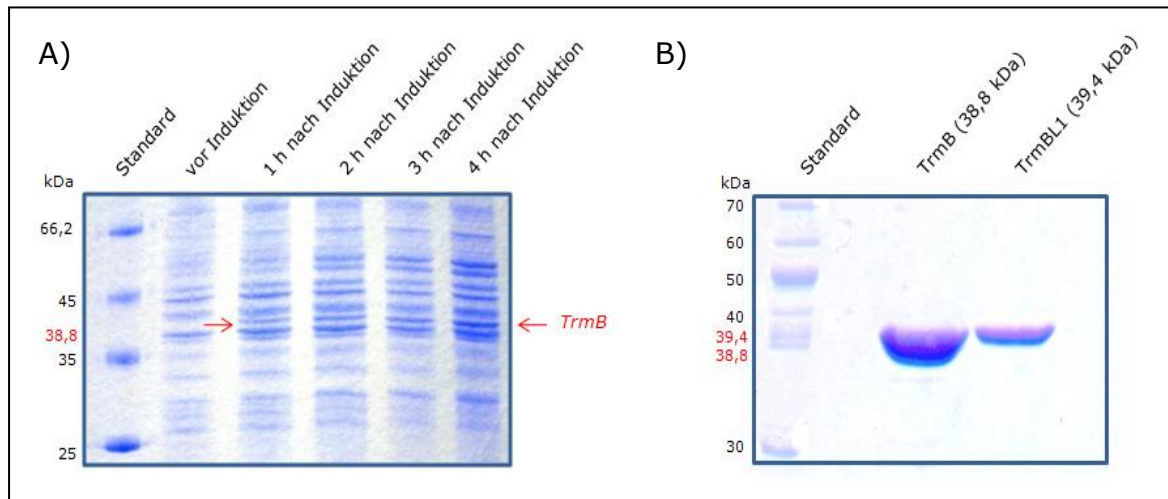


Abb.11: SDS-PAGE von TrmB und TrmBL1.

Darstellung auf einem 12%igen, mit Coomassie Blue gefärbten SDS-Gel.

A) Expression von TrmB. Vor der Induktion ist keine TrmB-Bande bei 38,8 kDa zu sehen. Nach der Induktion mit IPTG wird TrmB exprimiert. Das Regulatorprotein ist im Gel nachweisbar (Bande bei 38,8 kDa 1–4 h nach der Induktion; rote Pfeile).

B) Gereinigtes TrmB (Bande bei 38,8 kDa) und TrmBL1 (Bande bei 39,4 kDa) nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie.

2.1.4. Proteinkonzentrationsbestimmung nach BRADFORD

Beim Bradford-Test handelt es sich um eine photometrische Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Coomassie Brilliant Blue G250 bildet in saurer Lösung Komplexe mit Proteinen, wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470 nm nach 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß der Proteinkonzentration der Lösung und kann photometrisch bestimmt werden. Dazu wird zunächst eine Eichgerade mit BSA (**B**ovine **S**erum **A**lbumin) erstellt. Neben dem Nullwert ohne BSA wurden vier BSA-Standards mit 2, 4, 8 und 12 ng in je 100 µl Elutionspuffer pipettiert und zu jedem Ansatz 900 µl Coomassie Brilliant Blue Solution (5x) gegeben. Für jede BSA-Konzentration wurden zwei Ansätze vorbereitet. Zusätzlich zu den BSA-Standards wurde eine 1:10 und eine 1:20-Verdünnung der zu bestimmenden Proteinlösung in je 100 µl Elutionspuffer vorbereitet und ebenfalls mit 900 µl Coomassie Brilliant Blue Lösung versehen. Die Ansätze wurden gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde von jedem Ansatz der OD-Wert bei 595 nm mit dem Photometer bestimmt (Beckman DU 640). Für die Eichgerade wurde pro BSA-Konzentration der OD₅₉₅-Mittelwert der zwei vorbereiteten Ansätze berechnet und gegen die Konzentration aufgetragen. Anhand der Eichgerade und der OD-Werte der zu bestimmenden Proteinlösung konnte die Proteinkonzentration der Lösung ermittelt werden.

Die Lagerung von TrmB bzw. TrmBL1 erfolgte in Elutionspuffer bei -20°C. Auf eine Dialyse wurde wegen der Instabilität der Proteine verzichtet.

2.1.5. Herstellung von TrmB- bzw. TrmBL1-Mutanten durch Site-Directed Mutagenesis

Um zu ermitteln, welche Bereiche in der DNA-Bindedomäne von TrmB bzw. TrmBL1 für die Bindung der beiden Regulatoren an die Zielpromotoren verantwortlich sind, wurden einzelne Aminosäuren durch Site-Directed Mutagenesis ausgetauscht. Hierzu wurde das QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (La Jolla, USA) verwendet. Diese Methode erlaubt es, gezielt Punktmutationen in einem Zielgen zu erzeugen, das sich in einem doppelsträngigen Vektor befindet.

Dazu wurde das Plasmid mit dem gewünschten Gen (pSL152 bzw. pCS19/TrmBL1) zuerst mit Hilfe des QIAprep spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerprotokoll aus dem entsprechenden *E. coli*-Stamm isoliert. Anschließend wurde die gewünschte Mutation mit geeigneten Primern in das Zielgen eingebaut. Zu

diesem Zweck wurden Primer verwendet, die komplementär zu beiden Strängen des Zielgens waren und die gewünschte Mutation enthielten. Die Primer wurden durch Einsatz einer *PfuUltra* High Fidelity DNA-Polymerase verlängert und zu einem vollständigen Plasmid ergänzt, welches die gewünschte Mutation im Zielgen enthält. Dazu wurde folgender Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl pipettiert:

Reaction buffer (10x)	2,5 µl
Plasmid mit Zielgen	25 ng
forward Primer mit Mutation (10 µM)	2 µl
reverse Primer mit Mutation (10 µM)	2 µl
dNTP-Mix	1 µl
<i>PfuUltra</i> HF DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl

ad 25 µl mit H₂O_{bidest}

Anschließend wurde der Ansatz im Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Personal) bei folgendem Programm gefahren:

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen</u>
	95°C	0:30	} 16
Hitzedenaturierung	95°C	0:30	
Annealing	55°C	1:00	
Amplifizierung	68°C	1 min/kb Plasmid	
	40°C	∞	

Danach wurden 0,5 µl *Dpn I*-Endonuklease (10 U/µl) in den Ansatz gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die *Dpn I*-Endonuklease greift spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA an und verdaut das ursprüngliche Plasmid ohne Mutation im Zielgen. Dabei ist es wichtig, dass das Plasmid im ersten Schritt aus einem dam⁺-*E. coli*-Stamm isoliert wurde, da nur Plasmide aus diesen Stämmen methyliert und somit für den *Dpn I*-Verdau empfindlich sind. Danach wurde das Plasmid mit dem mutierten Zielgen in *E.coli*-DHL5α kompetente Zellen transformiert (siehe Kap. II, 2.4.2). Positive Klone wurden mittels Kolonie-PCR mit pQE F/R-Primern identifiziert. Aus den positiven Klonen wurde das Plasmid mit dem mutierten Zielgen erneut isoliert (QIAprep spin Miniprep Kit) und zur Verifizierung der richtigen Gensequenz zum Sequenzieren geschickt (Geneart AG, Regensburg). Danach wurde

das Plasmid in einen geeigneten Expressionsstamm transformiert. Die anschließende Reinigung der Proteinmutanten erfolgte wie unter Kap. II, 2.1.1–2.1.4. beschrieben.

2.2. SDS–Polyacrylamid–Gelelektrophorese (SDS–PAGE)

Die SDS–PAGE ist eine biochemische Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Shapiro *et al.*, 1967). Sie kommt zum Einsatz, um Proteine in einer Lösung nachzuweisen und ihre Größe im Vergleich zu einem Proteinstandard abzuschätzen. Dabei werden die Proteine durch das anionische Detergenz SDS denaturiert und erhalten eine negative Gesamtladung, die sie im elektrischen Feld einheitlich vom Minuspol zum Pluspol wandern lässt. Dies erlaubt eine Auftrennung, die ausschließlich nach dem Molekulargewicht erfolgt. Bei der SDS–PAGE handelt es sich um eine diskontinuierliche Gelelektrophorese, bei der das Proteingemisch zuerst in einem großporigen Sammelgel (4% PA) aufkonzentriert und anschließend in einem engporigen Trenngel (12% PA) nach der Größe aufgetrennt wird. Zur Herstellung des Gels wurde zwischen die gereinigten Platten zuerst die 12%ige Trenngel–Lösung gegossen. Nach dem Polymerisieren wurde auf das Trenngel die 4%ige Sammelgel–Lösung pipettiert. Die Proben (je 20 µl) wurden mit jeweils 5 µl Lämmli–Auftragspuffer (siehe Kap. II, 1.3.2.) versehen und anschließend für 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Danach wurden sie zusammen mit einem Protein–Standard–Gemisch (PageRuler Protein Ladder, MBI Fermentas) auf das polymerisierte Sammelgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS–Laufpuffer bei 25 mA/180 V und Raumtemperatur in einer Elektrophoresekammer (PerfectBlue™ Vertical Electrophoresis Systems, Peqlab, Erlangen) bis zum Auslauf der Bromphenolblau–Bande. Zur Färbung und Fixierung der Proteinbanden wurde das Gel 30 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur in Coomassier Blue–Lösung inkubiert. Die Entfärbung des Gels erfolgte durch Aufkochen in Wasser. Daraufhin wurden die blauen Proteinbanden im Gel sichtbar. Anhand des Proteinstandards konnte die Größe des Proteins in der Testlösung bestimmt und so das Protein identifiziert werden. Abschließend wurde das Gel auf Whatman–Papier gelegt und 1 Stunde bei 80°C unter Vakuum getrocknet (DrygelSr Slab Gel Dryer, SE 1160, Hoeffer Scientific Instruments).

2.3. Aufreinigung der RNA-Polymerase (RNAP) aus *P. furiosus*

Die RNAP wurde direkt aus *P. furiosus*-Zellen gewonnen. Dazu wurde *P. furiosus* zuerst im 100 l -Fermenter in synthetischem Meerwassermedium unter anaeroben Bedingungen bei 95°C kultiviert und in der frühlogarithmischen Wachstumsphase geerntet. 92 g der Zellen wurden in 300 ml Zellaufschlusspuffer (pH 8,0) resuspendiert und über Nacht im Kühlraum gerührt. Anschließend wurde die Zelllösung auf Eis mit dem Ultraturrax (T-25, Janke & Kunkle) homogenisiert und danach 2x mit der French Press (SLM Instruments, Inc., Urbana, USA) bei 1200 p.s.i. aufgeschlossen. Zur Entfernung der Zellfragmente erfolgte eine Ultrazentrifugation des Zelllysats (90 min bei 4°C und 100000 g; Optima LE-80K, Beckman, USA). Die Aufreinigung der RNAP wurde dann über HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) in mehreren Schritten mit dem System AEKTA Purifier 12 (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Zuerst wurde der Überstand mit den löslichen Bestandteilen über Nacht bei 4°C gegen Biorex-Puffer +100 (pH 8,0) dialysiert. Das Dialysat wurde anschließend einer Kationenaustauschchromatographie unterzogen. Dazu wurde es auf eine mit BioRex 70 (Bio-Rad, USA) gepackte und mit Biorex-Puffer +100 äquilibrierte FPLC XK50/30-Säule (Bio-Rad, USA) aufgetragen und in einem linearen Gradienten von 0–100% mit Biorex-Puffer +1000 (pH 8,0) über 3 Säulenvolumen eluiert. Fraktionen mit RNAP-Aktivität wurden über einen TCA (Trichloracetat)-Test identifiziert. Dabei wurden 10 µl Probe mit 90 µl Fertigmix (+ 7 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP pro 1 ml Fertigmix) versetzt und 40 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in 1 ml Stop-Mix überführt und auf einen Whatman GF/C Filter gegeben, auf den zuvor 2,5 ml 5%iges TCA pipettiert wurden. Die Probe wurde abgesaugt und 3mal mit je 5 ml 5%igem TCA gewaschen. Nach einem letzten Waschschrift mit 5 ml Ethanol wurde der Filter getrocknet und in ein Szintillationscocktail (Rotiszint ecoplus) überführt. Die auf dem Filter verbliebene Radioaktivität wurde mit dem Szintillationszähler ermittelt und war ein Maß für die RNAP-Aktivität in der Probe.

RNAP-positive Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen TMK-Puffer +100 (pH 7,5) dialysiert. Das Dialysat wurde dann auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte Heparin-Sepharose-Säule (HiPrep 16/10 Heparin FF) aufgetragen. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten von 0–100% mit TMK-Puffer 800 (pH 7,5) über 15 Säulenvolumen. Die RNAP-Aktivität der Fraktionen wurde erneut mittels TCA-Test bestimmt. Anschließend wurden positive Fraktionen in einer Gradienten-SDS-PAGE (8-20% PA) analysiert, vereinigt und über Nacht gegen TMK-Puffer +100 (pH 7,0) dialysiert.

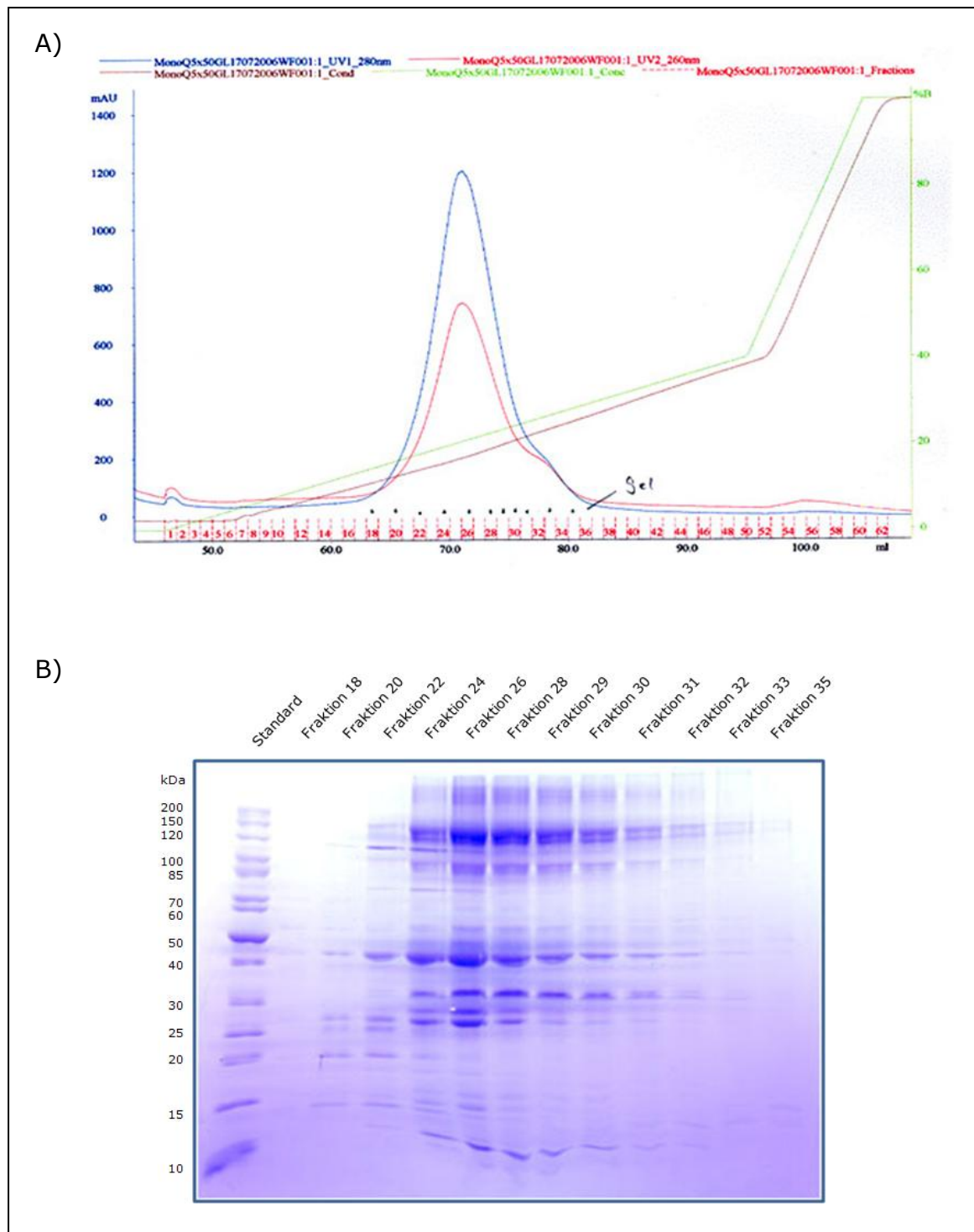


Abb.12: Aufreinigung der RNA-Polymerase aus *P. furiosus*.

A) Graphische Darstellung der Anionenaustausch-Chromatographie mit der MonoQ 5/50GL-Säule.

Fraktionen, die RNAP enthalten, wurden durch das Maß der UV-Absorption bei 280 nm in mAU (milli Absorption Units) identifiziert (-> Peak). Die RNAP eluierte bei 30% TMK-Puffer +800 (pH 7,0).

B) Darstellung der Fraktionen im Peak Bereich des MonoQ-Diagramms auf einem 8–20%igen SDS-Gradientengel (mit Coomassie Blue gefärbt). Auf dem Gel sind die verschiedenen Untereinheiten der RNAP zu erkennen.

Es folgte eine Anionenaustauschchromatographie mit einer äquilibrierten MonoQ 10/100GL-Säule. Eluiert wurde mit TMK-Puffer +800 (pH 7,0) in einem linearen Gradienten von 0-60% über 20 Säulenvolumen. RNAP-positive Fraktionen wurden wieder mit Hilfe des TCA-Tests bestimmt und in einer Gradienten-SDS-PAGE analysiert. Anschließend wurden sie vereinigt, mit TMK-Puffer +0 (pH 7,0) auf 100 mM KCl eingestellt und auf eine äquilibrierte MonoQ 5/50-Säule aufgetragen. Die Elution der RNAP erfolgte über 50 Säulenvolumen in einem linearen Gradienten von 0-40% TMK-Puffer +800 (pH 7,0) und dann über 10 Säulenvolumen in einem linearen Gradienten von 40-100% mit demselben Puffer (Abb. 12A). Nach einem weiteren TCA-Test und einer Analyse der Fraktionen im Peak-Bereich des MonoQ-Diagramms durch eine 8-20%ige Gradienten-SDS-PAGE (Abb. 12B) wurden RNAP-positive Fraktionen ein letztes Mal identifiziert und auf ihre Reinheit überprüft. Die Fraktionen wurden dann vereinigt und die RNAP-Konzentration mittels Bradford-Test gegen BSA (siehe Kap. II, 2.1.4.) bestimmt. Abschließend wurden 50 µl-Aliquots der RNAP-Lösung bei -80°C eingefroren und gelagert.

Alle verwendeten Säulen stammten von Amersham Biosciences, UK.

2.4. Herstellung von DNA-Matrizen für *in vitro* Versuche

2.4.1. Amplifikation von DNA-Matrizen für *in vitro* Transkriptionsversuche mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR=Polymerase Chain Reaction) handelt es sich um eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen mit Hilfe spezifischer Oligonukleotidprimer. Auf diese Weise kann die für die Versuche notwendige Menge an Matrizen-DNA hergestellt werden. Die in der PCR verwendeten Primer sind dabei zu DNA-Sequenzen komplementär, welche das zu amplifizierende DNA-Fragment flankieren. Die PCR erfolgt in mehreren Zyklen, wobei die beiden DNA-Stränge zuerst aufgeschmolzen werden. In einer anschließenden Annealing-Phase lagern sich die Primer an ihre komplementären Sequenzen an. Die RNA-Polymerase greift dann in der Elongationsphase an den Primern an und ergänzt die fehlenden Nukleotide. In dieser Arbeit kam eine Phusion High Fidelity DNA-Polymerase (New England Biolabs) zum Einsatz, die eine höhere Prozessivität besitzt als die herkömmliche *Taq*-Polymerase.

Die PCR-Ansätze (je 100 µl) setzten sich folgendermaßen zusammen:

Phusion Buffer (5x)	20 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
forward Primer (10 µM)	8 µl
reverse Primer (10 µM)	8 µl
Plasmid-DNA (5 ng/µl)	12 µl
Phusion DNA-Polymerase (2 U/µl)	1,5 µl

ad 100 µl mit H₂O_{bidest}

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Personal) bei folgendem Programm:

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen</u>
	98°C	0:30	} 30
Hitzedenaturierung	98°C	0:15	
Annealing	58°C	0:30	
Amplifizierung	72°C	0:30	
	72°C	5:00	
	4°C	∞	

Zur Überprüfung des PCR-Produkts wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, bei der die negativ geladenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld vom Minuspol zum Pluspol wandern und dabei nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Dazu wurden 5 µl des PCR-Produkts mit 1 µl Auftragspuffer (6x) versehen und auf ein 1,5%iges Agarose-Gel pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte für 45 Minuten in 1x TBE-Puffer bei 70 mA/100 V und Raumtemperatur. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert dabei zwischen die Basen der DNA, wobei das Anregungsspektrum des Farbstoffs verändert und die Fluoreszenz bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird. Eine erfolgreiche Amplifizierung ließ sich so nach dem Gellauf mit einem UV-Transilluminator (Biodocit, 366 nm) nachweisen. Ein mitgeführter Standard mit definierten DNA-Molekülen erlaubte eine Größenbestimmung des PCR-Produkts. Die Reinigung des Produkts erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerprotokoll. Die Konzentrationsbestimmung des gereinigten PCR-Produkts erfolgte mit dem Nanodrop (Peglab, Erlangen).

2.4.2. Klonierung von DNA-Matrizen

Um eine bestimmte DNA-Matrize zu sichern und durch Amplifikation mit einer PCR leicht zugänglich zu machen, wurde die gewünschte DNA-Sequenz in das Plasmid pUC19 ligiert und anschließend in den *E. coli*-Stamm DHL5 α transformiert.

Zuerst wurde die gewünschte DNA-Sequenz aus genomischer DNA von *P. furiosus* durch PCR mit geeigneten Primern vervielfältigt (siehe Kap. II, 2.4.1). Die Primer besitzen dabei am 5'-Ende Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme BamHI bzw. HindIII und EcoRI, um die Ligation in pUC19 zu ermöglichen. Um das DNA-Fragment über die entsprechenden Schnittstellen in die multiple Klonierungsstelle des Plasmids ligieren zu können, wurde sowohl das gereinigte PCR-Produkt als auch das Plasmid pUC19 einer Restriktionshydrolyse mit den Enzymen BamHI bzw. HindIII und EcoRI unterzogen. Dazu wurden folgende Ansätze pipettiert:

Ansatz 1

PCR-Produkt (50 ng/ μ l)	29,5 μ l
BamHI bzw. HindIII (20 U/ μ l)	1 μ l
Eco RI (20 U/ μ l)	1 μ l
NeBuffer 2 (10x)	3,5 μ l

Ansatz 2

pUC19 (50 ng/ μ l)	5 μ l
BamHI bzw. HindIII (20 U/ μ l)	1 μ l
Eco RI (20 U/ μ l)	1 μ l
NeBuffer 2 (10x)	2 μ l
H ₂ O _{bidest}	11 μ l

Beide Ansätze wurden 90 Minuten bei 37°C inkubiert, danach mit 7 μ l (Ansatz 1) bzw. 4 μ l (Ansatz 2) Auftragspuffer (6x) versehen und komplett auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die entsprechenden Banden unter dem UV-Transilluminator (Biodocit, 366 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und das geschnittene DNA-Fragment bzw. Plasmid mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert. Anschließend konnte das DNA-Fragment in das Plasmid ligiert werden. Für die Ligation wurde im Vergleich zur Plasmidkonzentration ein Überschuss an geschnittenem PCR-Produkt zugegeben, um zu verhindern, dass das Plasmid ohne Einbau des DNA-Fragments wieder zu einem Ring geschlossen wird.

Es wurde folgender Ansatz pipettiert:

geschnittenes DNA-Fragment (50 ng/μl)	16 μl
linearisiertes Plasmid (50 ng/μl)	1 μl
Ligation Buffer (10x)	2 μl
T4-Ligase (1 U/μl)	1 μl

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Danach konnte das Plasmid, welches nun das gewünschte DNA-Fragment enthielt, in kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes DHL5α transformiert werden.

Dazu wurden 16 μl Ligationsansatz in 70 μl kompetente Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschritt für 90 Sekunden bei 42°C. Nach weiteren 2 Minuten Inkubation auf Eis wurden 400 μl vorgewärmtes LB-Medium zum Transformationsansatz gegeben und dann 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 50 μl des Ansatzes auf eine LB-Platte ausplattiert, die zur Selektion transformierter Klone 100 ng/μl Ampicillin enthielt. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C bebrütet.

Zur Identifizierung positiver Klone, die das rekombinante Plasmid mit dem gewünschten DNA-Fragment enthielten, wurden einzelne Kolonien gepickt und in einer Kolonie-PCR getestet. Bei positiven Klonen zeigte sich nach der Agarose-Gelelektrophorese eine Bande der erwarteten Größe des DNA-Fragments. Zur weiteren Absicherung wurde das Plasmid aus den positiven Klonen isoliert (QIAprep spin Miniprep Kit) und die DNA-Sequenz analysiert (Geneart, Regensburg).

Zur Sicherung des rekombinanten Plasmids wurden von den entsprechenden Klonen Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden 200 μl einer ÜN-Kultur des Klons mit 800 μl sterilem Glycerin vermischt und sofort bei -80°C eingefroren.

2.4.3. Herstellung immobilisierter DNA-Matrizen

Zur Immobilisierung von DNA-Matrizen wurden mit Streptavidin ummantelte Magnetpartikel (Roche, Mannheim) verwendet. Bei Streptavidin handelt es sich um ein Protein, das von dem Bakterium *Streptomyces avidinii* produziert wird und aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut ist. Jede dieser Untereinheiten bindet Biotin mit hoher Affinität. Die Streptavidin-Biotin-Bindung macht man sich zunutze, um verschiedene Biomoleküle (DNA, Protein etc.) an eine feste Oberfläche zu binden. Die gewünschte DNA-Matrize wurde zuerst mit Hilfe geeigneter Primer in einer PCR (siehe Kap. II, 2.4.1.) amplifiziert. Der forward Primer besaß dabei ein Biotin-tag am

5'-Ende, über das die Matrize im Anschluss an die Magnetpartikel gebunden wurde. Dazu wurden zunächst 50 µl (0,5 mg) Magnetpartikel-Lösung in ein 1,5 ml-Eppendorf Cup gegeben und mit 90 µl Bindepuffer A gewaschen. Mit Hilfe eines Magneten wurden die Partikel von der Lösung separiert und der Überstand verworfen. Der Waschschrift wurde 3-mal wiederholt. Zu den gewaschenen Magnetpartikeln wurden 90 µl Bindepuffer B und 45 µl des PCR-Produktes zugegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur langsam im Rotamix (ELMI Rotamix RM1) geschüttelt. Danach wurden die Partikel mit der nun über den Biotin-tag gebundenen DNA-Matrize mit einem Magneten separiert. Auf die Partikel wurden erneut 90 µl Bindepuffer B und 45 µl PCR-Produkt gegeben und der Bindschritt noch einmal wiederholt. Der Überstand wurde jeweils auf einem Agarose-Gel analysiert. Die Bindung war erfolgreich, wenn im Überstand kein DNA-Signal im Gel nachzuweisen war. Die Partikel mit der gebundenen DNA wurden zwei weiteren Waschschritten unterzogen und dabei jeweils vorsichtig in 90 µl Waschpuffer C resuspendiert, 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und im Magnetfeld separiert. Abschließend wurden die Partikel in 90 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.4.4. Herstellung radioaktiv markierter DNA-Matrizen

Um die Ergebnisse der EMSA- und DNaseI Footprinting-Versuche mit Hilfe von Image Plates auswerten zu können, mussten die verwendeten DNA-Matrizen zuerst mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP radioaktiv markiert werden. Dies erfolgte während der Amplifizierung der gewünschten DNA-Matrize durch PCR mit radioaktiv markierten Primern. Zur Markierung der Primer wurde folgender 20 µl-Ansatz pipettiert:

forward bzw. reverse Primer (10 µM)	2 µl
[$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP	4 µl
PNK buffer (10x)	2 µl
PNK (10 U/µl)	2 µl
H ₂ O _{bidest}	10 µl

Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Der markierte Primer (forward Primer zur Markierung des codierenden Stranges; reverse Primer zur Markierung des codogenen Stranges) wurde dann in die PCR-Reaktion zur Amplifizierung der gewünschten DNA-Matrize eingesetzt (siehe Kap. II, 2.4.1.).

2.5. In vitro Transkriptionsversuche

Die *in vitro* Transkriptionsversuche wurden nach dem speziell für *P. furiosus* entwickelten, zellfreien Transkriptionssystem nach Hethke *et al.* (1996) mit den rekombinanten Transkriptionsfaktoren TBP und TFB, sowie der aufgereinigten, endogenen RNA-Polymerase aus *P. furiosus* (siehe Kap. II, 2.3.) durchgeführt. Das System wurde dabei für die hier verwendeten Promotoren optimiert.

Für die Transkription wurden 25 µl-Ansätze vorbereitet, die jeweils Transkriptionspuffer I, Transkriptionspuffer II bzw. Transkriptionspuffer III in der unter Kap. II, 1.3.5. angegebenen Endkonzentration enthielten. Welcher Puffer verwendet wurde, ist bei den jeweiligen Versuchen im Ergebnisteil angegeben. Die Ansätze enthielten außerdem je 167 nM TBP, 118 nM TFB und 32 nM RNAP. Als DNA-Matrize kamen je 150 fmol PCR-Produkt zum Einsatz, welches die zu untersuchende Promotorregion enthielt (siehe Kap. II, 2.4.1 und 2.4.3.). Von den verschiedenen DNA-Matrizen wurden immer äquimolare Mengen verwendet, um einen direkten Vergleich der Resultate zu ermöglichen. Des Weiteren wurden in jeden Ansatz je 1 µl NTP-Mix und 2 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP pipettiert. Das radioaktiv markierte UTP diente dabei zur Markierung und zum Nachweis der während der Transkription gebildeten mRNA. Wie im Ergebnisteil angegeben, enthielten die Ansätze außerdem verschiedene Konzentrationen der Regulatorproteine TrmB bzw. TrmBL1 sowie unterschiedliche Mengen der Zucker Maltose, Maltotriose, Sucrose, Fructose bzw. Glucose. Bei Versuchen mit Regulatorproteinen wurde außerdem ein Pufferausgleich durchgeführt, um eine identische Salzkonzentration in jedem Ansatz herzustellen.

Zur Transkription wurden die Reaktionsansätze 30 Minuten bei 80°C im Thermocycler (Eppendorf, Mastercycler personal) inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit je 10 µl Auftragspuffer versetzt und 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Zum Nachweis der Transkripte wurden 10 µl pro Ansatz auf ein 7 bzw. 10%iges Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetragen und einer 90minütigen RNA-Gelelektrophorese in 1x TBE-Puffer bei Raumtemperatur und 25 mA/400 V unterzogen, wobei gebildete mRNA-Moleküle nach der Größe aufgetrennt wurden. Zur Detektion der Transkripte wurde das Gel auf Whatman-Papier übertragen, mit Frischhaltefolie bedeckt und eine Image Plate (Fuji, Japan) aufgelegt. Nach einer Inkubation über Nacht bei -20°C konnte das Ergebnis mit Hilfe eines Image-Analyzers (Fuji, FLA-5000, Japan) ausgewertet werden.

2.6. Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)

Um die Bindung von TrmB, TrmBL1 und den jeweiligen Mutanten an die verschiedenen Promotoren nachzuweisen, wurden EMSA-Versuche durchgeführt. Dabei macht man sich den Umstand zunutze, dass die Mobilität einer DNA-Matrize mit gebundenem Protein während der Elektrophorese geringer ist als bei der freien DNA. Bindet ein Protein an die DNA-Matrize, ist dies an einem sog. Shift der DNA-Bande im Gel zu erkennen.

Als DNA-Matrize für die EMSA-Experimente diente ein mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP markiertes PCR-Produkt, das die zu untersuchende Promotorregion enthielt (siehe Kap. II, 2.4.4.). Die 25 μl -Ansätze enthielten EMSA-Puffer in der unter Kap. II, 1.3.7. angegebenen Endkonzentration und jeweils 30 ng der DNA-Matrize. Wie im Ergebnisteil angegeben, wurden außerdem unterschiedliche Mengen an Regulatorprotein zupipettiert. Die Ansätze wurden dann zur Bindereaktion 15 Minuten bei 70°C im Thermocycler (Eppendorf, Mastercycler personal) inkubiert, auf 40°C abgekühlt und sofort auf ein nicht denaturierendes 6%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 2 Stunden in 1x TBE-Puffer bei Raumtemperatur und 25 mA/200 V durchgeführt. Die Auswertung erfolgte wie unter Kap. II, 2.5. beschrieben mit dem Image-Analyzer (Fuji, FLA-5000, Japan).

2.7. DNaseI-Footprinting

Zur Bestimmung der genauen Bindestellen von TrmB und TrmBL1 an den verschiedenen Promotoren wurden DNaseI Footprinting-Experimente durchgeführt. Das Enzym DNaseI verdaut die DNA-Matrize und erzeugt so DNA-Bruchstücke verschiedener Länge. Bei einer Sequenz-Gelelektrophorese wandern die DNA-Fragmente proportional zu ihrer Länge mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, so dass man auf dem Gel ein kontinuierliches Bandenmuster erhält. Bindet ein Protein an die DNA-Matrize, so ist die DNA im Bindebereich des Proteins vor dem DNaseI-Verdau geschützt. Auf dem Gel ist eine Unterbrechung des Bandenmusters zu erkennen, da DNA-Fragmente fehlen, deren Länge in den Bindungsbereich des Proteins fällt. Diese Lücke im Bandenmuster wird als „Footprint“ bezeichnet. Um einen deutlichen Footprint zu erhalten, müssen die Versuche unter „single hit“-Bedingungen durchgeführt werden, d.h. die DNaseI- und DNA-Konzentrationen müssen so aufeinander abgestimmt werden, dass jedes DNA-Molekül nur einmal geschnitten wird.

Wie bei den EMSA-Versuchen wurde ein mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP markiertes PCR-Produkt der zu untersuchenden Promotorregion als DNA-Matrize verwendet (siehe Kap. II, 2.4.4.). Die Reaktionsansätze besaßen ein Gesamtvolumen von je 25 μl und enthielten DNaseI-Footprinting-Puffer I bzw. -Puffer II in der unter Kap. II, 1.3.8. angegebenen Endkonzentration, sowie 100 ng der markierten DNA-Matrize. Wie im Ergebnisteil angegeben, wurden je nach Versuch verschiedenen Konzentrationen TrmB, TrmBL1 bzw. Maltose zugegeben.

Die Ansätze wurden dann für 15 Minuten bei 70°C im Thermocycler (Eppendorf, Mastercycler personal) inkubiert. Danach wurden je nach Ansatz zwischen 0,0025 und 0,03 Units DNaseI (Roche, Mannheim) zugegeben und 5 Minuten bei 40°C inkubiert. Die DNaseI-Konzentrationen wurden dabei auf den jeweiligen Promotor optimiert. Sie sind im Ergebnisteil bei den jeweiligen Versuchen angegeben. Allgemein wurde in Ansätzen ohne Regulatorprotein weniger DNaseI eingesetzt als in Ansätzen, die Regulatorprotein enthielten. Unmittelbar im Anschluss folgte eine Phenolextraktion, wodurch auch die DNA-Hydrolyse gestoppt wurde. Dazu wurden in jeden Ansatz 25 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben, gut gemischt und 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 C). Anschließend wurden 18 μl des Überstandes in ein frisches Cup überführt und mit 54 μl eiskaltem Ethanol und 1,8 μl 3 M Natriumacetat versetzt. Die Ansätze wurden dann zur Fällung der DNA über Nacht bei -20°C inkubiert. Danach wurde die DNA 20 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert und in 10 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ resuspendiert. Nach Zugabe von 3 μl Auftragspuffer wurden die Ansätze 3 Minuten bei 95°C denaturiert und danach je 6 μl auf ein 7%iges PA/Harnstoff-Sequenzgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde über 2 Stunden in 1x TBE-Puffer bei Raumtemperatur und 80 mA/2200 V in der Sequenzgelapparatur (Bio-Rad, Sequi-Gen GT Sequencing Cell) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte wie unter Kap. II, 2.5. beschrieben mit dem Image-Analyzer (Fuji, FLA-5000, Japan).

2.7.1. Herstellung eines Sequenzstandards

Um die genaue Position der Bindestelle des Regulatorproteins im Promotorbereich eines Gens über einen Footprint bestimmen zu können, muss bei der Sequenzgel-Elektrophorese ein Sequenzstandard der entsprechenden DNA-Matrize mitgeführt werden. Um einen Sequenzstandard des codierenden Stranges der DNA-Matrize herzustellen, wurde der Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB, Cleveland, USA) verwendet. Es wurde folgender 17,5 μl -Ansatz pipettiert:

Plasmid mit Zielsequenz (150 ng/μl)	3 μl
Reaction Buffer	2 μl
[$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP markierter forward primer	5 μl
Thermo Sequenase DNA-Polymerase (4 U/μl)	2 μl
H ₂ O _{bidest}	5,5 μl

Zur Herstellung eines Sequenzstandards des codogenen Stranges wurde anstelle des forward Primers ein entsprechend markierter reverse Primer verwendet. Anschließend wurden je 4 μl des Reaktionsansatzes zu je 4 μl ddATP, ddTTP, ddGTP und ddCTP Termination Mix pipettiert und folgendem Programm im Thermocycler (Eppendorf, Mastercycler personal) unterzogen:

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen</u>
Hitzenaturierung	95°C	0:30	} 60
Annealing	58°C	0:30	
Amplifizierung	72°C	2:00	
	4°C	∞	

Nach Zugabe von jeweils 4 μl Stop Solution wurde pro Nukleotid-Ansatz 1 μl zusammen mit den unter Kap. II., 2.7. beschriebenen Versuchsansätzen auf das Sequenzgel aufgetragen.

III. Ergebnisse

1. TrmB reguliert die Transkription von TM- und MD-Promotor induktorspezifisch

2003 und 2005 belegten Lee *et al.*, dass der Regulator TrmB aus *Pyrococcus furiosus* die Expression des TM- und MD-ABC-Transporters und damit die Aufnahme von Maltose, Trehalose und Maltodextrinen in die Zelle kontrolliert, indem er die Transkription der TM- und MD-Gencluster reprimiert. TrmB bindet dabei im Promotorbereich der entsprechenden Operons und verhindert so die Bindung der Transkriptionsfaktoren TBP und TFB bzw. die Rekrutierung der RNA-Polymerase (vgl. Abb. 7). Mit Hilfe von *in vitro* Transkriptionsversuchen mit TrmB an einer TM- bzw. MD-Promotor-Matrize in Ab- und Anwesenheit verschiedener Zucker konnte nachgewiesen werden, dass die TrmB-vermittelte Hemmung der Transkription an beiden Promotoren induktorspezifisch aufgehoben wird.

1.1. Die Trehalose/Maltose (TM)-Promotor-Matrize

Die Promotorregion des Trehalose/Maltose (TM)-Genclusters mit dem Anfangsbereich des *malE* Gens (PF1739) lag zu Beginn der Arbeit bereits kloniert im Vektor pUC19 vor. Sie wurde im Bereich der multiplen Klonierungsstelle des Plasmids über die EcoRI- und BamHI-Schnittstellen in den Vektor ligiert. Das so entstandene Konstrukt erhielt die Bezeichnung pMLP (Lee *et al.*, 2003). Die TM-Promotor-Matrize wurde über eine PCR-Amplifizierung mit den Primern M13/pUC F und M13/pUC R gewonnen und besaß eine Gesamtlänge von 484 bp (Abb. 13).

Der TM-Promotorbereich besitzt zwei TrmB-Bindestellen, wobei sich die eine direkt über der BRE/TATA-Box des TM-Promotors und die andere im Bereich einer inverted repeat-Sequenz befindet (vgl. Kap. III, 1.2.). Der Transkriptionsstart (+1) wird von einem Guanin markiert, das 26 Nukleotide stromabwärts der BRE/TATA-Box bzw. 17 Nukleotide stromaufwärts des Translationsstarts von *malE* lokalisiert ist (Lee *et al.*, 2003). Bei der *in vitro* Transkription lieferte die TM-Promotor-Matrize ein run-off Produkt einer Länge von 156 nt.

Für EMSA- und DNaseI Footprinting-Versuche wurde für die PCR-Amplifizierung der Matrize ein [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP markierter M13/pUC F Primer verwendet.

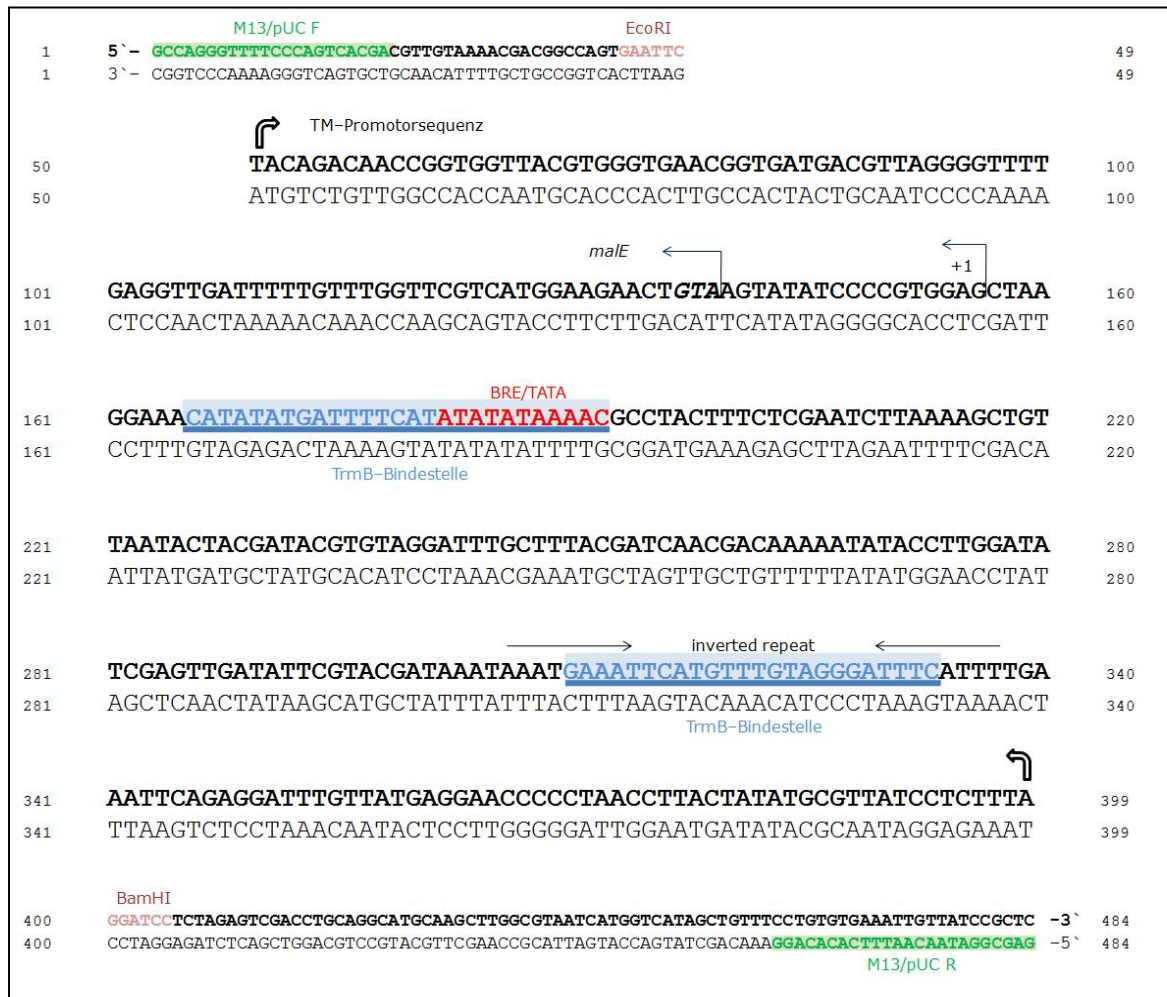


Abb. 13: Trehalose/Maltose (TM)-Promotor-Matrize.

Die TM-Promotorregion mit dem Anfangsbereich des *malE* Gens wurde über die EcoRI- und BamHI-Schnittstellen (rosa dargestellt) in den Vektor pUC19 kloniert und über PCR mit den Primern M13/pUC F und R (grün dargestellt) amplifiziert. Das so gewonnene PCR-Produkt (Länge: 484 bp) wurde als Matrize in EMSA-, DNaseI Footprinting- und *in vitro* Transkriptionsversuchen eingesetzt.

Der BRE/TATA-Bereich ist rot dargestellt; die TrmB-Bindestellen sind blau hervorgehoben. +1 markiert den Transkriptionsstart von *malE*.

1.2. Bestimmung der TrmB-Bindestellen des TM-Promotors durch DNaseI Footprinting

Die TrmB-Bindestellen von TrmB am TM-Promotor wurden bereits 2003 von Lee *et al.* mittels DNaseI Footprinting ermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Versuch noch einmal wiederholt und verfeinert. Die DNaseI Footprinting-Versuche wurden mit einer TM-Promotor-Matrize durchgeführt, deren codierender Strang zuvor am 5'-Ende mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP markiert wurde. Nach Hydrolyse der DNA-Matrize mit DNaseI wurden die so gewonnen DNA-Fragmente auf ein Sequenzgel

aufgetragen und analysiert. Wie in Abb. 14A zu sehen ist, wurde die TM-Promotor-Matrize im Ansatz mit 1,5 μM TrmB (Spur 2) in zwei Bereichen vor dem Abbau durch DNaseI geschützt. In der Kontrolle ohne TrmB war dagegen keine Unterbrechung des Fragmentmusters zu erkennen (Spur 1). Der TM-Promotor besitzt demnach zwei TrmB-Bindestellen. Ein Abgleich mit dem Sequenzstandard des TM-Promotors macht deutlich, dass eine Bindestelle stromaufwärts der BRE/TATA-Box zwischen Position -177 bis -154 zu finden ist und mit einer inverted repeat-Sequenz überlappt (a). Sie besitzt die Nukleotidsequenz „5′-CTTTAGGGATGTTTGTAC TTAAAG-3′“. Die andere Bindestelle ist im Bereich -36 bis -10 stromaufwärts des Transkriptionsstarts direkt über der BRE/TATA-Box lokalisiert (b). Die Nukleotidsequenz des geschützten Bereichs ist hier „5′-CAAATATATATACTTTTAGTATATAC-3′“.

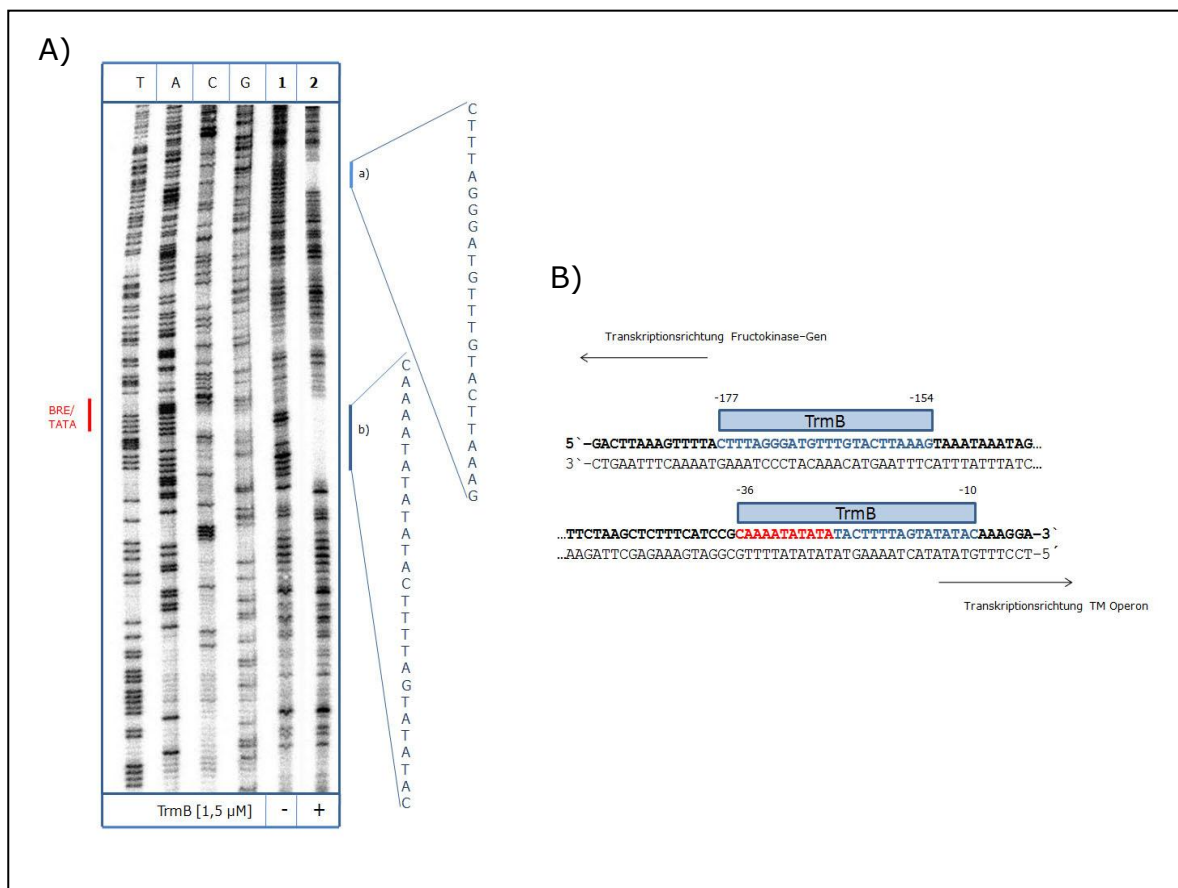


Abb.14: DNaseI Footprinting-Analyse des Trehalose/Maltose (TM)-Promotors mit TrmB

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel; DNaseI Footprinting-Puffer I.

A) Ein DNaseI-Verdau wurde am codierenden Strang des TM-Promotors in Ab- (1) und Anwesenheit (2) von 1,5 μM TrmB durchgeführt. In a) und b) sind die Bereiche dargestellt, die durch Bindung von TrmB vor dem DNaseI-Verdau geschützt wurden. Die mit T, A, C und G markierten Spuren stellen die Sequenzreaktionen dar. Die Position der BRE/TATA-Box ist rot hervorgehoben. Es kamen pro Ansatz 100 ng TM-Promotor-Matrize und 0,01 U (Spur 1) bzw. 0,03 U (Spur 2) DNaseI zum Einsatz.

B) Zusammenfassung der Footprint-Daten. Die Bindestellen von TrmB sind mit einem blauen Kasten gekennzeichnet. TrmB bindet im Bereich des inverted repeat bei -177 bis -154 und im Bereich der BRE/TATA-Box (rot dargestellt) von -36 bis -10.

In Abb. 14B sind die Footprint-Daten für TrmB am TM-Promotor noch einmal zusammengefasst. Frühere *in vitro* Transkriptionsversuche mit einer verkürzten TM-Promotor-Matrize, die nur die TrmB-Bindestelle im Bereich der BRE/TATA-Box enthielt, lassen vermuten, dass nur diese Bindestelle für die Regulation des TM-Operons ausschlaggebend ist (Surma, 2005). Die Bindung von TrmB an diesen Bereich verhindert die Ausbildung eines Präinitiationskomplexes und verursacht so eine Hemmung der Transkription. Die zweite TrmB-Bindestelle an Position -177 bis -154 ist vermutlich für die Regulation des benachbarten Fructokinase-Gens von Wichtigkeit, das in entgegengesetzte Richtung zum TM-Gencluster transkribiert wird.

1.3. Die Maltodextrin (MD)-Promotor-Matrize

Die Promotorregion des Maltodextrin (MD)-Genclusters mit dem Anfangsbereich des Gens *mdxE* (PF1938) lag zu Beginn der Arbeit bereits kloniert im Vektor pUC19 vor. Die Zielsequenz wurde über die EcoRI- und HindIII-Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle in den Vektor ligiert. Das so entstandene Konstrukt erhielt die Bezeichnung pSL195 (Lee *et al.*, 2005). Mit Hilfe der Primer M13/pUC F und M13/ pUC R konnte ein PCR-Produkt einer Länge von 348 bp gewonnen werden, das als Matrize für die *in vitro* Experimente eingesetzt wurde (Abb. 15).

Der MD-Promotor besitzt eine TrmB-Bindestelle, die stromabwärts der BRE/TATA-Region lokalisiert ist und den Transkriptionsstart überlappt (vgl. Kap. III, 1.4.). Der Transkriptionsstart (+1) liegt bei einem Guanin, das sich 24 Nukleotide stromabwärts der BRE/TATA-Box bzw. 27 Nukleotide stromaufwärts des Translationsstarts von *mdxE* befindet (Lee *et al.*, 2005). Die MD-Promotor-Matrize lieferte ein run-off Transkript einer Länge von 168 nt. Neben der TrmB-Bindestelle besitzt der MD-Promotor auch eine Bindestelle für TrmBL1, die ein TGM-Motiv enthält (vgl. Kap. III, 5.2.). Die TrmBL1-Bindestelle ist ebenfalls stromabwärts der BRE/TATA-Box lokalisiert und überlappt die Bindestelle von TrmB.

Für EMSA- und DNaseI Footprinting-Versuche wurde für die PCR-Amplifizierung der Matrize ein [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP markierter M13/pUC F bzw. M13/pUC R Primer verwendet.

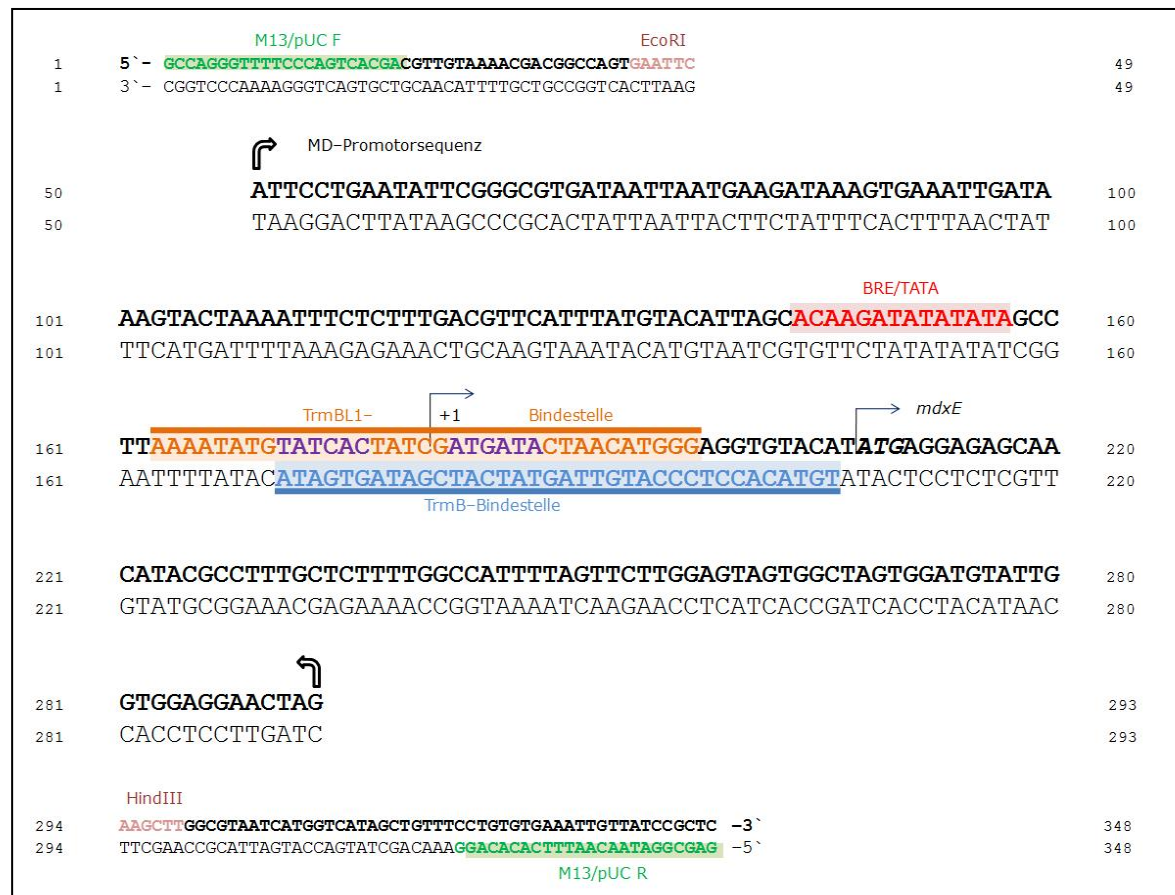


Abb. 15: Maltodextrin (MD)-Promotor-Matrize.

Die MD-Promotorregion mit dem Anfangsbereich des *mdxE* Gens wurde über die EcoRI- und HindIII-Schnittstellen (rosa dargestellt) in den Vektor pUC19 kloniert und über PCR mit den Primern M13/pUC F und R (grün dargestellt) amplifiziert. Das so gewonnene PCR-Produkt (Länge: 348 bp) wurde als Matrize in EMSA-, DNaseI Footprinting-, und *in vitro* Transkriptionsversuche eingesetzt.

Die BRE/TATA-Box des MD-Promotors ist rot dargestellt. Die TrmB-Bindestelle ist blau und die TrmBL1-Bindestelle orange hervorgehoben. Das TGM-Motiv ist lila dargestellt. Beide Bindestellen befinden sich im Bereich des Transkriptionsstarts von *mdxE*, der mit +1 markiert ist.

1.4. Bestimmung der TrmB-Bindestelle des MD-Promotors durch DNaseI Footprinting

Die TrmB-Bindestelle des MD-Promotors wurde ebenfalls über DNaseI Footprinting-Versuche bestimmt. Bereits 2005 wurde von Lee *et al.* ein entsprechender Versuch am codierenden Strang des MD-Promotors durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Versuch noch einmal wiederholt. Allerdings ist es nur für den codogenen Strang gelungen, einen Footprint mit TrmB zu erzeugen. Dazu wurde eine am 3'-Ende mit [γ^{32} P]-ATP markierte MD-Promotor-Matrize einer DNaseI-Hydrolyse unterzogen. Im Autoradiogramm in Abb. 16A ist im Ansatz mit 4,5 μ M TrmB (Spur 3) im Vergleich zum Ansatz ohne TrmB (Spur 1) ein Footprint zu erkennen.

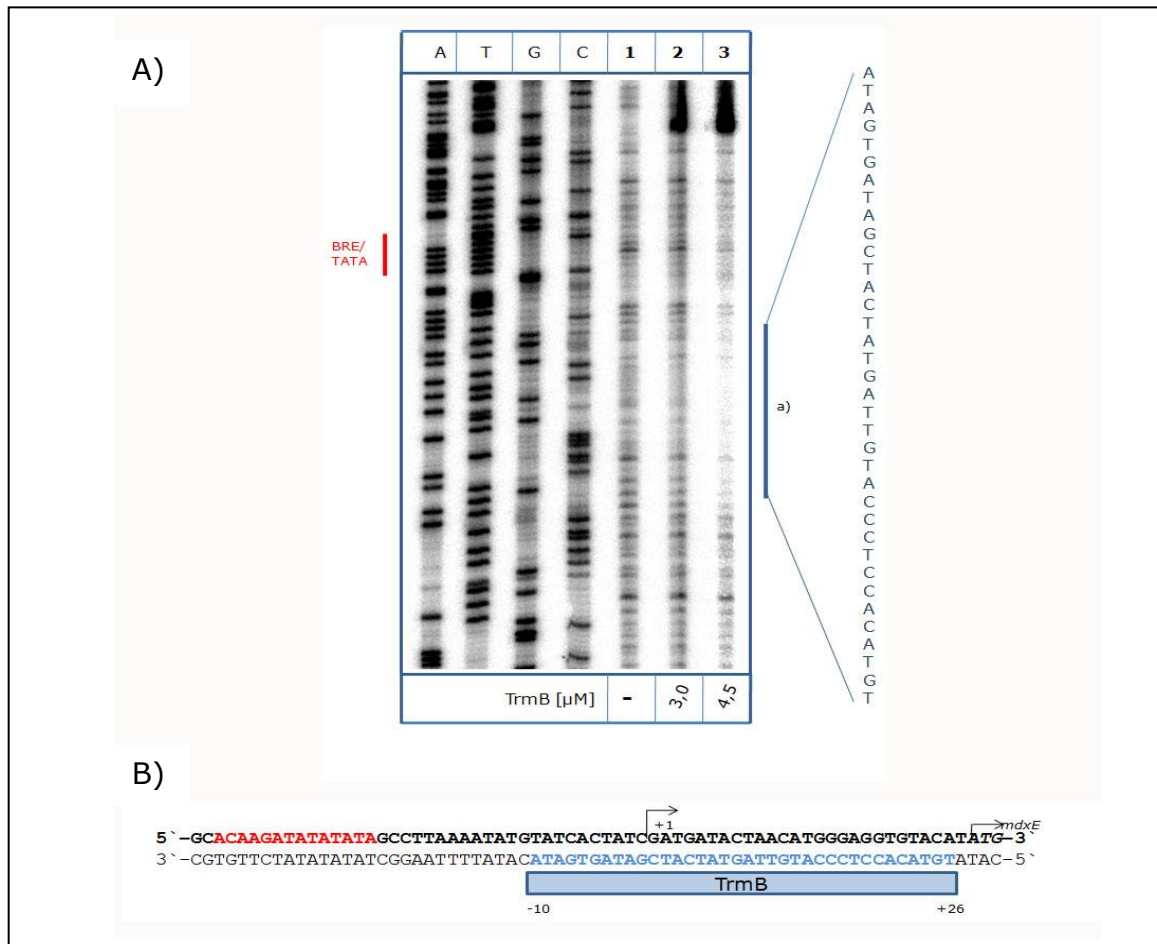


Abb.16: DNaseI Footprinting-Analyse des Maltodextrin (MD)-Promotors mit TrmB

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel; DNaseI Footprinting-Puffer I.

A) Ein DNaseI-Verdau wurde am codogenen Strang des MD-Promotors in Ab- (1) und Anwesenheit von 3,0 μ M (Spur 2) bzw. 4,5 μ M TrmB (Spur 3) durchgeführt. In a) ist der Bereich dargestellt, der durch Bindung von TrmB vor dem DNaseI-Verdau geschützt wurde. Die mit A, T, G und C markierten Spuren stellen die Sequenzreaktionen dar. Die Position der BRE/TATA-Box ist rot hervorgehoben. Pro Ansatz kamen 100 ng MD-Promotor-Matrize und 0,005 U (Spur 1) bzw. 0,01 U (Spuren 2 und 3) DNaseI zum Einsatz.

B) Zusammenfassung der Footprint-Daten. Die Bindestelle von TrmB ist mit einem blauen Kasten gekennzeichnet. TrmB bindet im Bereich des Transkriptionsstarts (+1) bei Position -10 bis +26. Die BRE/TATA-Box ist rot hervorgehoben.

Geringere TrmB-Konzentrationen wie 3,0 μ M TrmB in Spur 3 lieferten dagegen keinen sichtbaren Footprint. TrmB besitzt folglich eine größere Affinität für den TM-Promotor, bei dem schon 1,5 μ M TrmB für einen deutlichen Footprint ausreichend waren (vgl. Abb. 14A).

Ein Abgleich mit dem Sequenzstandard des MD-Promotors belegt, dass sich der von TrmB geschützte Bereich des codogenen Strangs zwischen Position -10 und +26 befindet und die Nukleotidsequenz „3`-ATAGTGATAGCTACTATGATTGTACCCTCCACATGT-5`“ besitzt. Die TrmB-Bindestelle des MD-Promotors überlappt demnach

nicht wie beim TM-Promotor die BRE/TATA-Box, sondern befindet sich weiter stromabwärts im Bereich des Transkriptionsstarts und reicht bis hin zum Translationsstart von *mdxE*. Bei der Bindung von TrmB an diesen Bereich wird deshalb vermutlich die Rekrutierung der RNA-Polymerase verhindert und so die Transkription inhibiert. In Abb. 16B sind die Footprint-Daten für TrmB am MD-Promotor noch einmal zusammengefasst.

1.5. *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmB am TM- und MD-Promotor in Anwesenheit verschiedener Zucker

Der Regulator TrmB bindet im Promotorbereich des TM- und MD-Genclusters und hemmt die Transkription, indem er die Bindung der Transkriptionsfaktoren bzw. die Rekrutierung der RNA-Polymerase verhindert. Mit Hilfe von *in vitro* Transkriptionsversuchen konnte nachgewiesen werden, dass die TrmB-vermittelte Hemmung der Transkription an beiden Promotoren durch unterschiedliche Induktoren wieder aufgehoben werden kann (vgl. auch Lee *et al.*, 2003 und 2005).

In Abb. 17 sind die Ergebnisse von *in vitro* Transkriptionsversuchen mit TrmB am TM- und MD-Promotor in Anwesenheit von 0,05 bis 2,50 mM verschiedener Zucker zu sehen. Spur 1 stellt jeweils die basale Transkription ohne TrmB und Zucker dar. Hier ist bei beiden Promotoren ein deutliches Transkriptionssignal (\triangleq 100%) zu erkennen. Bei Zugabe von TrmB (Spur 2) wurde die Transkription gehemmt und das Signal blieb aus. Bei Einsatz äquimolarer Mengen an Promotor-Matrize war für eine vollständige Hemmung der Transkription beim MD-Promotor im Vergleich zum TM-Promotor die 4 bis 5fache Menge an TrmB nötig (vgl. Surma, 2005). In Abb. 17A sind die Transkriptionsversuche mit Maltose zu sehen. Wurden zusätzlich zu TrmB steigende Mengen Maltose zugegeben, wurde die TrmB-vermittelte Hemmung am TM-Promotor wieder aufgehoben (Spuren 3–8). Bei 0,10 mM Maltose betrug die Signalstärke bereits wieder 44% der basalen Transkription (Spur 4). Ab 0,50 mM Maltose wurde die Hemmung vollständig aufgehoben und die Signalstärke erreichte 100% und mehr (Spuren 6–8). Im Falle des MD-Promotors hatte Maltose jedoch keinen Einfluss auf die TrmB-vermittelte Hemmung der Transkription. Auch bei Zugabe von 2,50 mM Maltose erreichte die Aktivität im Vergleich zur basalen Transkription nur 9% (Spur 8). Maltose wirkt für TrmB also nur am TM-Promotor als Induktor. Wurden anstatt Maltose steigende Mengen an Maltotriose zugegeben, war das genaue Gegenteil der Fall (Abb. 17B). Die TrmB-vermittelte Hemmung am TM-Promotor konnte hier von Maltotriose nicht rückgängig gemacht werden.

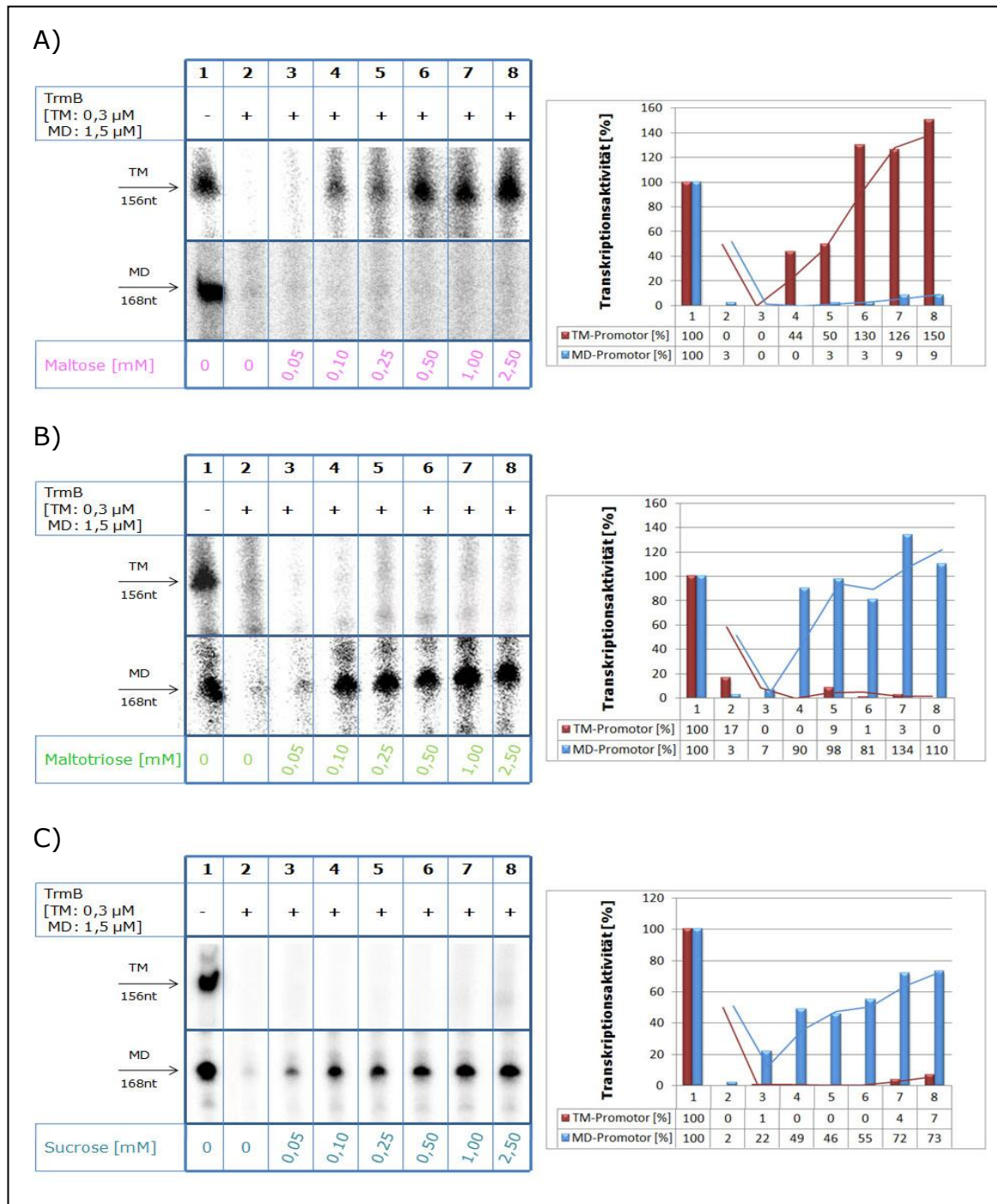


Abb. 17: Spezifische Induktoren an TM- und MD-Promotor.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer III (A,B) bzw. II (C).

Zu sehen ist der Effekt von steigenden Konzentrationen (jeweils 0,05–2,50 mM) Maltose (A), Maltotriose (B) bzw. Sucrose (C) auf die Transkription am TM- und MD-Promotor in Anwesenheit von 0,3 bzw. 1,5 μ M TrmB (Spuren 3–8). Spuren 1 und 2 stellen die Kontrollen ohne und mit TrmB in Abwesenheit von Zuckern dar. Am TM-Promotor ist Maltose ein Induktor; am MD-Promotor sind Maltotriose und Sucrose Induktoren.

Pro Ansatz kamen je 150 fmol Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Quantifizierungen mit Trendlinien sind in den Diagrammen auf der rechten Seite dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%). Dunkelrote Balken repräsentieren die Transkriptionsaktivität des TM-Promotors, blaue Balken die des MD-Promotors.

Die Signalstärke bewegte sich im Vergleich zur basalen Transkription auch bei höheren Maltotriose-Konzentrationen nur zwischen 0 und 9 % (Spuren 3–8). Für den MD-Promotor wirkte Maltotriose allerdings eindeutig als Induktor. Hier wurde die Hemmung bei nur 0,25 mM Maltotriose wieder vollständig aufgehoben (Signalstärke 98%, Spur 5).

Auch Sucrose ist wie Maltotriose nur am MD-Promotor ein Induktor (Abb. 17C). Die Zugabe steigender Mengen Sucrose konnte die TrmB-vermittelte Hemmung am TM-Promotor nicht rückgängig machen. Im Vergleich zur basalen Transkription erreichte die Signalstärke hier nur 7% bei 2,50 mM Sucrose (Spur 8).

Am MD-Promotor ist Sucrose ein schwächerer Induktor als Maltotriose und konnte die Hemmung bei den getesteten Sucrose-Konzentrationen nicht vollständig aufheben. Bei 2,50 mM Sucrose stieg die Transkriptionsaktivität hier auf 73% (Spur 8); mit Maltotriose wurden bei derselben Konzentration 110% erreicht (Abb. 17B, Spur 8).

Die unterschiedliche Wirkung der getesteten Zucker an TM- und MD-Promotor ist in den Quantifizierungsdiagrammen in Abb. 17 deutlich zu erkennen. Maltose ist ein Induktor für den TM-Promotor und kann dort die TrmB-vermittelte Hemmung aufheben. Beim MD-Promotor zeigt Maltose jedoch keine Wirkung. Dasselbe gilt für Trehalose (Lee *et al.*, 2003). Umgekehrt können die Effektoren des MD-Promotors, Sucrose, Maltotriose und längere Maltodextrine (Lee *et al.*, 2005), die Transkription nur am MD-Promotor induzieren, nicht aber am TM-Promotor. Diese Ergebnisse machen die ausgeprägte, promotorabhängige Zuckerspezifität von TrmB deutlich.

2. Die Nukleotidsequenz der TrmB-Bindestelle bestimmt die Bindeaffinität und Induktorspezifität des Regulators

Wie durch die Footprint-Daten mit TrmB am TM- und MD-Promotor deutlich geworden ist, erkennt TrmB an beiden Promotoren unterschiedliche Nukleotidsequenzen (vgl. Kap. III, 1.2 und 1.4.). Da an den jeweiligen Promotoren für TrmB unterschiedliche Zucker als Induktoren wirken, stellt sich die Frage, inwiefern die Nukleotidsequenz der TrmB-Bindestelle bei der Induktorspezifität des Regulators eine Rolle spielt.

2.1. Mutationsanalyse der TrmB-Bindestelle des TM-Promotors

Betrachtet man die TrmB-Bindestelle des TM-Promotors genauer, fällt eine palindromische Nukleotidsequenz der Abfolge „5´-**TACTTTTAGTA**-3´“ ins Auge, die bei der Promotorerkennung durch TrmB eine entscheidende Rolle spielen könnte. Der erste Abschnitt dieses Palindroms ist auch in der TrmB-Bindestelle des MD-Promotors zu finden. Der zweite Teil fehlt dort jedoch (vgl. Abb. 18A). Um zu untersuchen, ob es sich bei dieser Konsensussequenz tatsächlich um ein Bindemotiv von TrmB handelt, wurden TM-Promotor-Matrizen hergestellt, die Mutationen in verschiedenen Bereichen des Palindroms besaßen (Lee *et al.*, 2005). Anschließend wurde mit *in vitro* Transkriptionsversuchen getestet, ob TrmB an diese Mutanten binden und somit die Transkription hemmen kann. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abb. 18B dargestellt. Die Spuren 6–8 stellen jeweils die Kontrollen mit dem wt TM-Promotor ohne TrmB, mit 0,3 µM TrmB sowie mit TrmB und 5,0 mM Maltose dar. In den Spuren 1–5 sind die entsprechenden Ansätze mit den jeweiligen Promotor-Mutanten abgebildet.

Bei der Mutante TM2 wurde der zweite Teil des Palindroms durch die Sequenz GACT ausgetauscht (Abb. 18B a). Während 0,3 µM TrmB die Transkription am wt TM-Promotor deutlich hemmten (Spur 7), blieb die Transkriptionsaktivität am TM2-Promotor mit 83% auch in Anwesenheit von TrmB nahezu vollständig erhalten (Spur 2). Die Zugabe von Maltose hatte hier somit auch keinen Effekt (Spuren 3–5), während die TrmB-vermittelte Hemmung am wt TM-Promotor wie erwartet von Maltose aufgehoben wurde (Spur 8). Auffällig ist außerdem, dass das Transkript des TM2-Promotors im Vergleich zum Produkt der wt TM-Promotor-Matrize deutlich kürzer war.

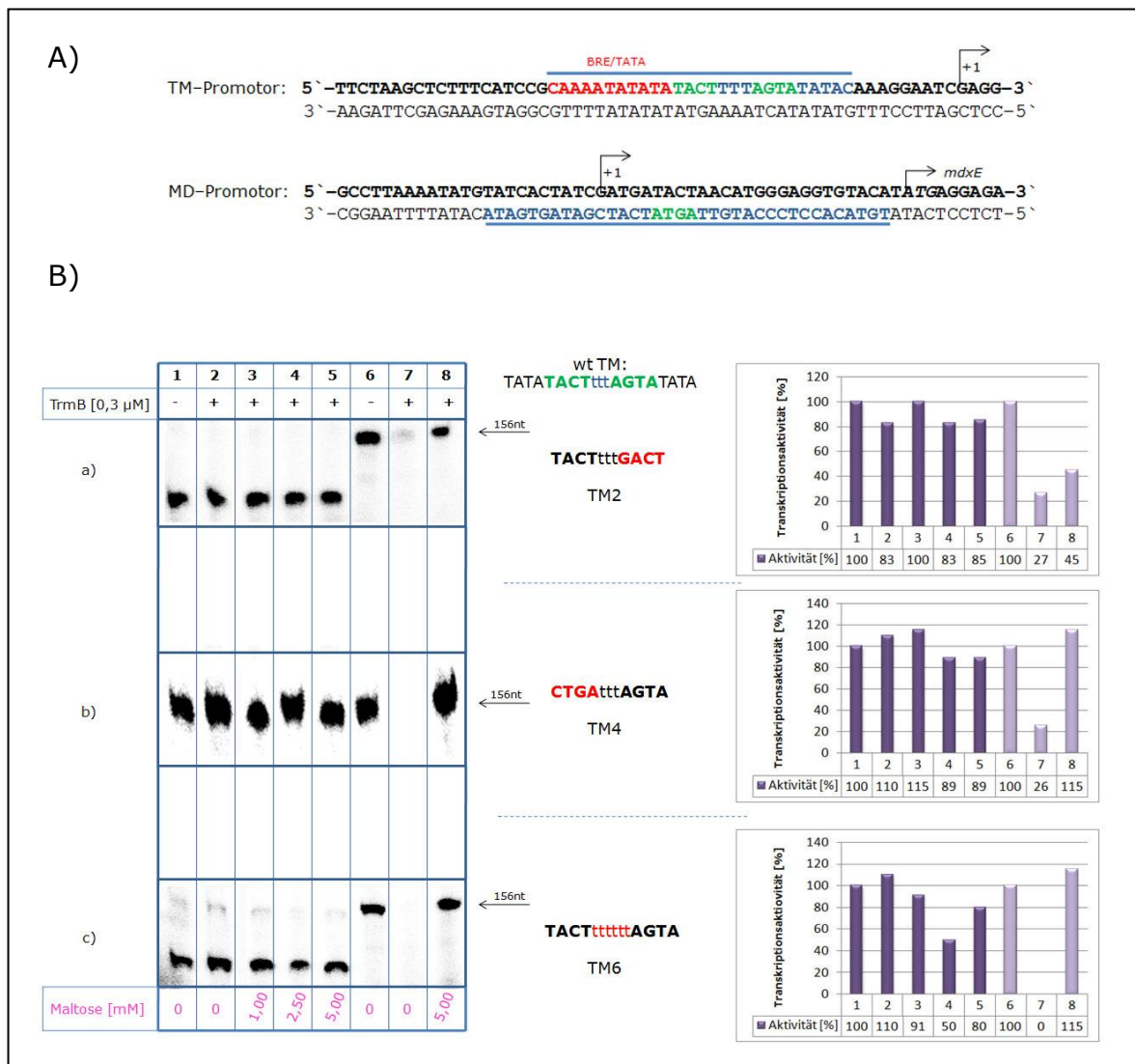


Abb. 18: Die palindromische Konsensussequenz "5'-TACTTTTAGTA-3'".

A) Vergleichende Darstellung der TrmB-Bindestellen von TM- und MD-Promotor (blau unterstrichen). Die TrmB-Bindestelle des TM-Promotors enthält die palindromische Sequenz "5'-**TACTTTTAGTA**-3'" (grün dargestellt). Die TrmB-Bindestelle des MD-Promotors besitzt nur den ersten Teil des Palindroms. B) *In vitro* Transkriptionsversuche mit 0,3 µM TrmB an den TM-Promotor-Mutanten TM2, TM4 und TM6. Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer I.

Spuren 6-8 stellen die Kontrollen mit dem wt TM-Promotor dar, Spuren 1-5 die Ansätze mit TM2 (a), TM4 (b) bzw. TM6 (c). Die Promotor-Mutanten haben im Vergleich zum wt Promotor ihre Affinität zu TrmB verloren.

Pro Ansatz kamen je 150 fmol TM-Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Quantifizierungen sind in den Diagrammen rechts dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

Die Transkriptionsaktivität der entsprechenden Promotor-Mutanten wird durch dunkle Balken, und die Aktivität der wt Promotor-Kontrollen durch helle Balken repräsentiert.

Auch die TM4-Promotor-Matrize scheint TrmB nicht mehr richtig binden zu können (Abb. 18B b). Hier wurde der erste Teil des Palindroms durch die Sequenz CTGA ausgetauscht. 0,3 μ M TrmB führten zu keiner Beeinträchtigung der Transkription beim TM4-Promotor (Signalstärke 110%, Spur 2), während die Transkription am wt TM-Promotor deutlich gehemmt wurde (Spur 7). Das Produkt von wt Promotor und TM4-Promotor besaß dieselbe Länge (156nt).

Beim TM6-Promotor wurde schließlich die Thymin-Sequenz zwischen den beiden Palindromhälften von drei auf sechs Nukleotide verlängert (Abb. 18B c). Auch in diesem Fall führten 0,3 μ M TrmB zu keiner Hemmung der Transkription (Signalstärke 110%, Spur 2). Wie beim TM2-Promotor war hier außerdem wieder eine Verkürzung des Transkripts zu beobachten.

Mutationen, die sich zwar innerhalb der TrmB-Bindestelle des TM-Promotors, aber außerhalb des Palindroms befanden, beeinträchtigten die Bindeaffinität von TrmB nur geringfügig. Auch ein Austausch der Thymin-Sequenz zwischen den beiden Palindromhälften durch drei andere Nukleotide hatte keine nennenswerte Auswirkung auf die Bindung von TrmB an den TM-Promotor (Lee *et al.*, 2005). Wurden jedoch Mutationen direkt innerhalb der beiden inverted repeat-Sequenzen durchgeführt (TM2 und TM4) oder der Zwischenbereich verlängert (TM6), ging dies mit einem deutlichen Verlust der Bindeaffinität und Repressorwirkung von TrmB einher. Die palindromische Sequenz TACT-N₃-AGTA scheint also ein essentielles Bindemotiv für TrmB zu sein. Dabei fällt weiterhin auf, dass Mutationen innerhalb der zweiten Hälfte des Palindroms zu einem verkürzten run-off Transkript führten (vgl. TM2 und TM6 in Abb. 18B a und c). Dieser Bereich scheint deshalb auch für die Bestimmung des Transkriptionsstarts von *malE* von Bedeutung zu sein.

Da der MD-Promotor nur die erste Hälfte des Palindroms besitzt, könnte dies eine Erklärung für die im Vergleich zum TM-Promotor deutlich geringere Bindeaffinität von TrmB am MD-Promotor sein.

2.2. *In vitro* Transkriptionsversuche am MDTA-Promotor

Neben der Bindeaffinität unterscheidet sich auch die Induktorspezifität von TrmB deutlich an TM- und MD-Promotor (vgl. Kap. III, 1.5). Da TrmB an beiden Promotoren unterschiedliche Bindestellen erkennt, sollte nun untersucht werden, ob die Nukleotidsequenz der jeweiligen TrmB-Bindestelle auch bei der Substraterkennung des gebundenen Regulators eine Rolle spielt. Dazu wurde die TrmB-Bindestelle des MD-Promotors mit Hilfe von Site Directed Mutagenesis durch die TrmB-Bindestelle des TM-Promotors ausgetauscht (Abb. 19A; Surma, 2005).

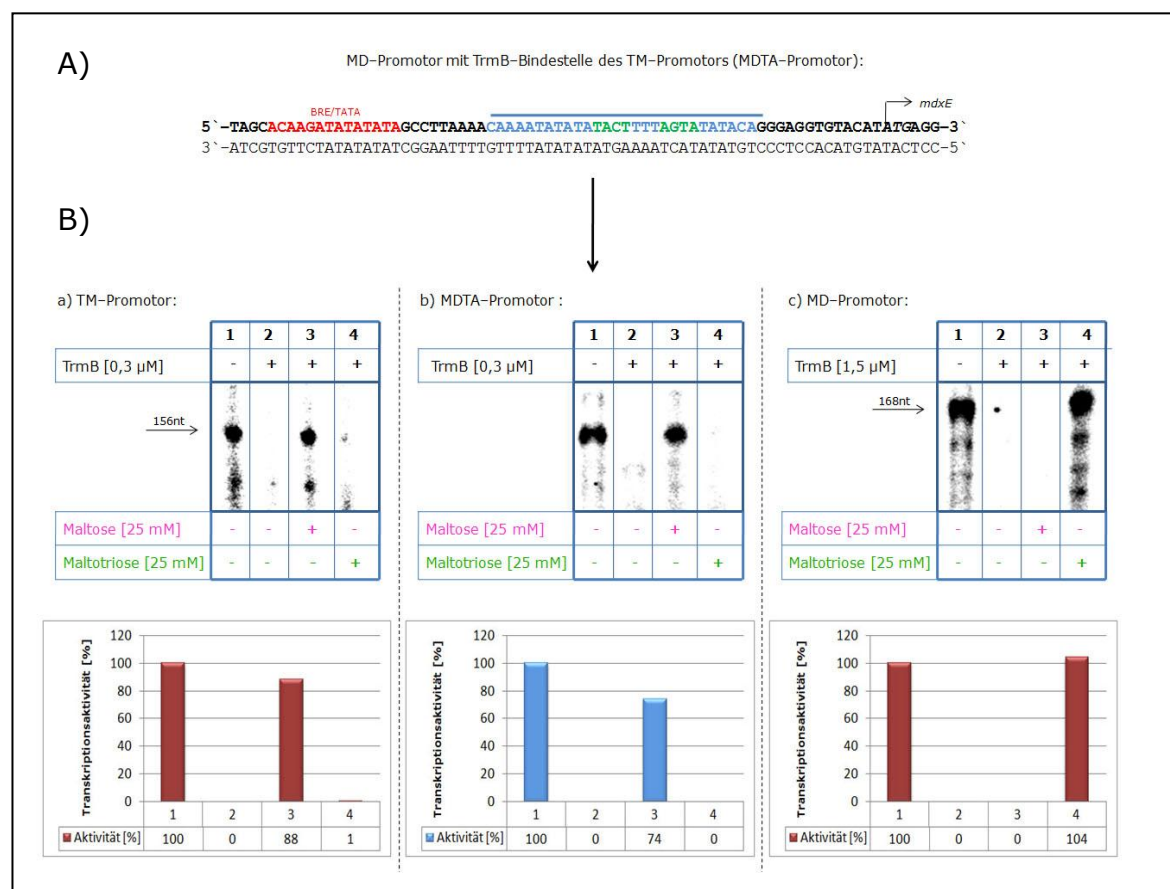


Abb. 19: Die Nukleotidsequenz der TrmB-Bindestelle bestimmt die Induktorspezifität.

A) Promotorregion des MDTA-Promotors. Es handelt sich dabei um ein Konstrukt des MD-Promotors, dessen TrmB-Bindestelle durch die TrmB-Bindestelle des TM-Promotors ausgetauscht wurde (blau dargestellt). Das TACT-N₃-AGTA-Motiv ist grün hervorgehoben.

B) *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmB und Induktoren am MDTA-Promotor im Vergleich mit TM- und MD-Promotor. Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer I. Unter a) und c) sind die Kontrollversuche am TM- bzw. MD-Promotor mit 0,3 bzw. 1,5 µM TrmB (Spur 2) und einem Überschuss (25 mM) an Maltose (Spur 3) bzw. Maltotriose (Spur 4) dargestellt. Unter b) sind die Ansätze mit dem MDTA-Promotor zu sehen. Dieser hat bezüglich Bindeaffinität und Induktorspezifität von TrmB die Eigenschaften des TM-Promotors übernommen.

Pro Ansatz kamen je 150 fmol Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Quantifizierungen sind in den Diagrammen unten dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

Das so entstandene MD-Promotor-Konstrukt (MDTA-Promotor) wurde dann in *in vitro* Transkriptionsversuchen mit TrmB und einem Überschuss an Maltose bzw. Maltotriose (25 mM) auf Bindeaffinität und Substratspezifität des Regulators getestet. In Abb. 19B a) und c) sind die Kontrollen mit dem TM- bzw. MD-Promotor dargestellt. Wie erwartet konnte am TM-Promotor die TrmB-vermittelte Hemmung durch Maltose wieder aufgehoben werden (Spur 3). Maltotriose ist hier kein Induktor (Spur 4). Beim MD-Promotor ist es umgekehrt und Maltotriose wirkt als Induktor, nicht aber Maltose. Betrachtet man nun die Ergebnisse für den MDTA-Promotor, ist zu erkennen, dass dieses MD-Promotor-Konstrukt sowohl in Bezug auf die Bindeaffinität als auch auf die Induktorspezifität von TrmB die Eigenschaften des TM-Promotors übernommen hatte (Abb. 19B b). Wie beim TM-Promotor waren hier bereits 0,3 μ M TrmB für eine vollständige Hemmung der Transkription ausreichend (Spur 2). Auch wirkte für den MDTA-Promotor nicht mehr Maltotriose induktisch, sondern Maltose. Bei Zugabe von 25 mM Maltose wurden 74% der basalen Transkriptionsaktivität erreicht (Spur 3), während bei Maltotriose das Signal ganz ausblieb (Aktivität 0%, Spur 4).

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Zuckerspezifität von TrmB von der Nukleotidsequenz der jeweiligen TrmB-Bindestelle bestimmt wird. Wahrscheinlich nimmt TrmB bei Bindung an verschiedene DNA-Sequenzen verschiedene Konformationen ein und erkennt deshalb seinerseits auch promotorabhängig unterschiedliche Substrate (vgl. auch Kap. I, 3.).

3. Anti-Induktoren am TM- und MD-Promotor

P. furiosus kann Maltose und Maltodextrine mit spezifischen ABC-Transportern in die Zelle schleusen. Dabei induzieren die Substrate der jeweiligen Transportsysteme die Expression der entsprechenden Gencluster (vgl. Kap. III, 1.5.). Glucose kann jedoch nicht aufgenommen werden, da kein entsprechender Transporter vorhanden ist. Trotzdem spielt Glucose als Produkt des Abbaus von Maltose bzw. Maltodextrinen eine zentrale Rolle im Zuckerstoffwechsel (vgl. Abb. 4) und gehört darüber hinaus zu den Substraten von TrmB (vgl. Kap. I, 3.). Es sollte deshalb untersucht werden, ob auch Glucose an der Regulation des TM- und MD-Operons in irgendeiner Weise beteiligt ist.

3.1. Glucose, Maltotriose und Sucrose sind Anti-Induktoren am TM-Promotor

Mit EMSA-Versuchen, die 2007 von Lee *et al.* durchgeführt wurden, konnte belegt werden, dass Glucose die Bindung von TrmB an den TM-Promotor stabilisiert. Bei gleichbleibender TrmB-Konzentration konnte bei EMSA-Versuchen der Shift durch Zugabe steigender Mengen Glucose verstärkt werden. Darüber hinaus konnte in Anwesenheit von Glucose bereits bei geringeren TrmB-Konzentrationen ein Shift erzeugt werden als in Ansätzen ohne Glucose. Mit Hilfe von *in vitro* Transkriptionsversuchen in Anwesenheit von TrmB und dem Induktor Maltose sollte nun der co-repressive Effekt von Glucose am TM-Promotor näher untersucht werden. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abb. 20 a) dargestellt. Die Spuren 1, 2 und 3 repräsentieren jeweils die Kontrollen ohne und mit 0,2 μM TrmB, sowie mit TrmB und 0,5 mM des Induktors Maltose, der die TrmB-vermittelte Hemmung der Transkription wie erwartet wieder aufhob (Spur 3). Wurden nun jedoch zusätzlich zu TrmB und Maltose steigende Mengen Glucose zugegeben, kam es trotz Anwesenheit des

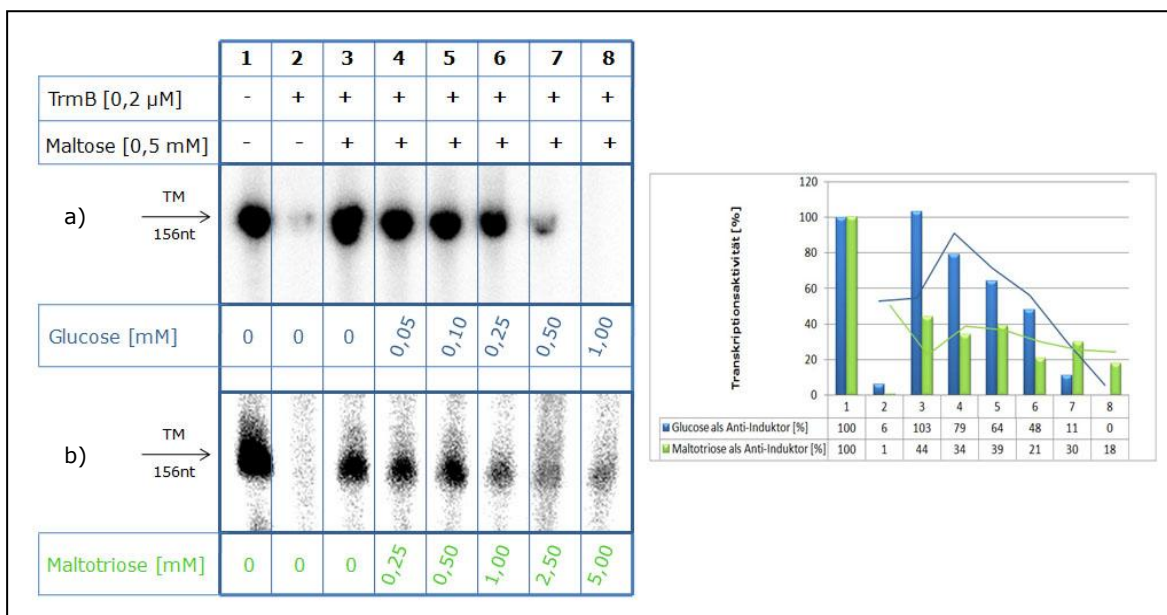


Abb. 20: Anti-Induktion von Glucose und Maltotriose am TM-Promotor.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer I.

Zu sehen ist der Effekt von steigenden Konzentrationen a) Glucose (0,05–1,00 mM) und b) Maltotriose (0,25–5,00 mM) auf die Transkription am TM-Promotor in Anwesenheit von 0,2 μM TrmB und 0,5 mM des Induktors Maltose (Spuren 4–8). Die Spuren 1, 2 und 3 stellen jeweils die Kontrollen ohne und mit TrmB, sowie mit TrmB und Maltose dar. Sowohl Glucose als auch Maltotriose wirken hier als Anti-Induktoren.

Pro Ansatz kamen je 150 fmol TM-Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Quantifizierungen mit Trendlinien sind im Diagramm rechts dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%). Blaue Balken repräsentieren die Transkriptionsaktivität in Ansätzen mit Glucose, grüne Balken die Aktivität in Ansätzen mit Maltotriose.

Induktors erneut zu einer vollständigen Hemmung der Transkription. Bei 0,05 mM Glucose sank die Transkriptionsaktivität bereits auf 79% (Spur 4), um bei 1,00 mM Glucose auf 0% abzufallen (Spur 8). Da Glucose die Fähigkeit besitzt, bei hohen Temperaturen mit Aminogruppen zu reagieren, bestand die Möglichkeit, dass der beobachtete Anti-Induktor-Effekt von Glucose auf eine diesbezügliche Beeinträchtigung der Transkriptionsmaschinerie zurückzuführen sein könnte und nicht auf eine tatsächliche Co-Repression. Um dies auszuschließen, wurden Transkriptionsversuche mit steigenden Mengen Glucose in Abwesenheit von TrmB und Maltose durchgeführt (Abb. 21). Der Versuch wurde vier Mal wiederholt, die Signalstärke quantitativ bestimmt und statistisch ausgewertet (siehe Diagramm in Abb. 21).

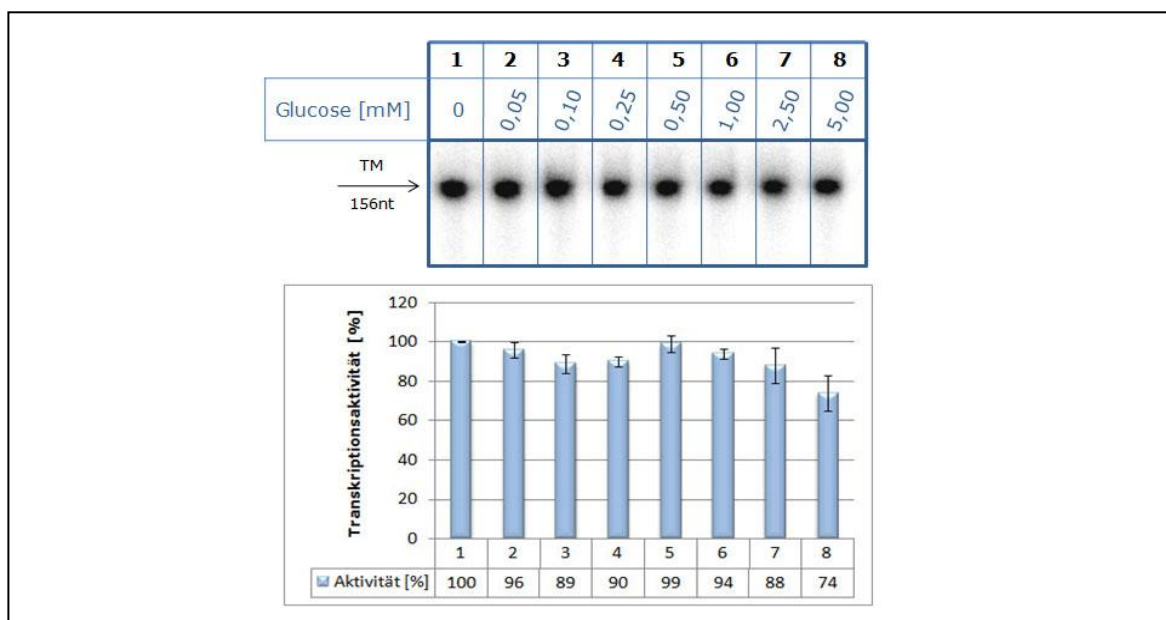


Abb. 21: Effekt von Glucose auf die Transkription.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer II.

Zu sehen ist der Effekt von steigenden Konzentrationen Glucose (0,05–5,00 mM) auf die Transkription am TM-Promotor in Abwesenheit von TrmB. Bis 5,00 mM Glucose (Spur 8) ist eine Reduktion der Signalstärke um ca. 25% zu verzeichnen.

Pro Ansatz kamen je 150 fmol TM-Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Quantifizierung (Mittelwert aller vier Versuche) mit Fehlerindikator ist im Diagramm unten dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

Dabei konnte festgestellt werden, dass größere Mengen Glucose die Transkription tatsächlich geringfügig beeinträchtigten. Bei 5,00 mM Glucose konnte eine Reduktion der Transkriptionsaktivität um 25% gemessen werden (Spur 8). Trotzdem fand die Transkription nach wie vor statt und es war auch bei 5,00 mM Glucose immer noch ein deutliches Signal zu erkennen. In Anwesenheit von TrmB wurde die Maltose-

induzierte Transkription aber komplett durch Glucose verhindert (Abb. 20 a), Spur 8). Hier verschwand das Transkriptionssignal bereits bei Zugabe von 1,00 mM Glucose vollständig, während die Aktivität im Kontrollansatz mit Glucose bei derselben Konzentration noch bei 94% lag (Abb. 21; Spur 6). Der in Abb. 20 a) zu beobachtende Effekt wurde somit nicht durch eine Glucose-bedingte Inaktivierung der Transkriptionsmaschinerie per se verursacht. Glucose wirkt vielmehr tatsächlich als Anti-Induktor, indem es die Bindung des Repressors an den TM-Promotor und somit die TrmB-vermittelte Hemmung verstärkt, so dass auch in Anwesenheit des Induktors Maltose die Transkription nicht mehr stattfinden kann.

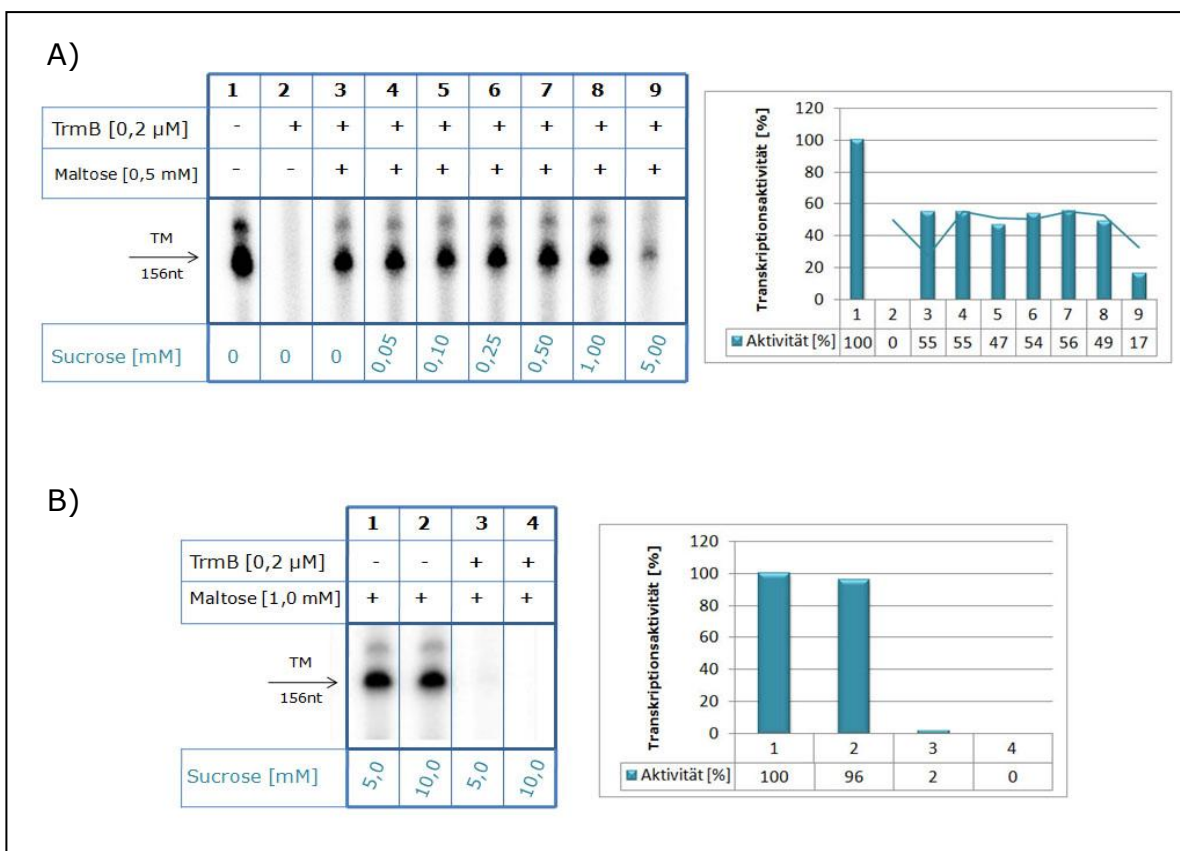


Abb. 22: Anti-Induktion von Sucrose am TM-Promotor.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer II.

Unter A) ist der Effekt von steigenden Konzentrationen Sucrose (0,05–5,00 mM) auf die Transkription am TM-Promotor in Anwesenheit von 0,2 μ M TrmB und 0,5 mM Maltose (Spuren 4–9) zu sehen. Die Spuren 1, 2 und 3 repräsentieren die Kontrollen ohne und mit TrmB, sowie mit TrmB und Maltose. Bei 5,00 mM Sucrose ist ein Anti-Induktor-Effekt zu erkennen.

Unter B) ist der Effekt von 5,0 mM (Spur 3) bzw. 10,0 mM Sucrose (Spur 4) auf die Transkription des TM-Promotors in Anwesenheit von 0,2 μ M TrmB und 1,0 mM Maltose dargestellt. Die Spuren 1 und 2 repräsentieren die Kontrollen mit Maltose und Sucrose ohne TrmB. In Abwesenheit von TrmB wird die Transkription nicht durch Maltose und Sucrose beeinträchtigt.

Pro Ansatz kamen je 150 fmol TM-Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Quantifizierungen sind in den Diagrammen rechts dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

Unter den Substraten von TrmB zeigten die Effektoren des MD-Promotors, Maltotriose und Sucrose, keine Induktor-Wirkung am TM-Promotor (vgl. Kap. III, 1.5.). Es sollte deshalb untersucht werden, ob sie womöglich stattdessen wie Glucose Anti-Induktoren für den TM-Promotor sein könnten.

In Abb. 20 b) sind entsprechende *in vitro* Transkriptionsversuche mit Maltotriose dargestellt. Tatsächlich wurde auch hier die Maltose-induzierte Transkription durch Zugabe steigender Mengen Maltotriose leicht gehemmt. Der co-repressive Effekt war jedoch deutlich schwächer als derjenige von Glucose. Bei Zugabe von 5,00 mM Maltotriose verringerte sich die Transkriptionsaktivität im Vergleich zur Maltose-induzierten Aktivität ohne Maltotriose (Spur 3) um nur 26% (Spur 8).

Dasselbe gilt für Sucrose (Abb. 22A). Auch hier wurde die Maltose-induzierte Transkription durch Anwesenheit von Sucrose inhibiert. Allerdings kam dieser Effekt ebenfalls erst bei höheren Sucrose-Konzentrationen zum Tragen (Spur 9). Um eine Beeinträchtigung der Transkription durch die Kombination größerer Mengen Maltose und Sucrose auszuschließen, wurden Kontrollansätze mit beiden Zuckern ohne und mit 0,2 μ M TrmB gefahren (Abb. 22B). Waren nur 1,0 mM Maltose und 5,0 bzw. 10,0 mM Sucrose in den Ansätzen enthalten, hatte dies keinen Einfluss auf die Transkription (Spuren 1 und 2). Wurden jedoch zusätzlich 0,2 μ M TrmB hinzugegeben, sank die Transkriptionsaktivität auf 0% (Spuren 3 und 4). Wie Glucose und Maltotriose wirkt Sucrose am TM-Promotor in Zusammenhang mit TrmB demnach als Anti-Induktor.

3.2. Glucose und Maltose sind Anti-Induktoren am MD-Promotor

In Anbetracht der co-repressiven Wirkung von Glucose, Maltotriose und Sucrose am TM-Promotor mit TrmB, sollte nun untersucht werden, ob Glucose und der Induktor des TM-Promotors, Maltose, am MD-Promotor im Zusammenhang mit TrmB ebenfalls als Anti-Induktoren fungieren könnten. EMSA-Versuche belegten, dass Glucose auch am MD-Promotor den TrmB-induzierten Shift verstärkt. Ähnliche Experimente mit Maltose waren jedoch wenig aussagekräftig, da es zu einer Aggregatbildung kam und die DNA in den Geltaschen verblieb (Lee *et al.*, 2007a). Um die Rolle von Glucose und Maltose am MD-Promotor weiter aufzuklären, wurden deshalb entsprechende *in vitro* Transkriptionsversuche am MD-Promotor durchgeführt (Abb. 23).

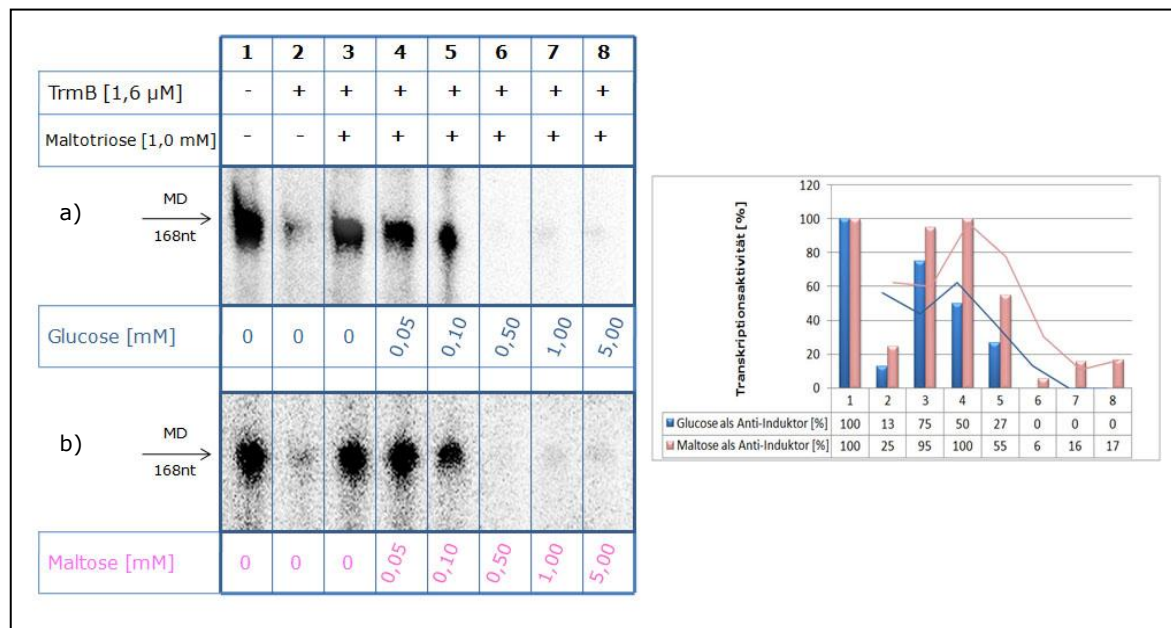


Abb. 23: Anti-Induktion von Glucose und Maltose am MD-Promotor.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer I.

Zu sehen ist der Effekt von steigenden Konzentrationen (0,05–5,00 mM) a) Glucose und b) Maltose auf die Transkription am MD-Promotor in Anwesenheit von 1,6 μ M TrmB und 1,0 mM des Induktors Maltotriose (Spuren 4–8). Die Spuren 1, 2 und 3 repräsentieren jeweils die Kontrollen ohne und mit TrmB, sowie mit TrmB und Maltotriose. Sowohl Glucose als auch Maltose wirken hier als Anti-Induktoren.

Pro Ansatz kamen je 150 fmol MD-Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Quantifizierungen mit Trendlinien sind im Diagramm rechts dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%). Blaue Balken repräsentieren die Transkriptionsaktivität in Ansätzen mit Glucose, rosa Balken die Aktivität in Ansätzen mit Maltose.

Die Spuren 1, 2 und 3 repräsentieren jeweils die Kontrollen ohne und mit 1,6 μ M TrmB, sowie mit TrmB und 1,0 mM Maltotriose. Wie erwartet wurde die TrmB-vermittelte Hemmung der Transkription durch Maltotriose wieder aufgehoben (Spur 3). Die Zugabe von steigenden Mengen Glucose führte wie beim TM-Promotor ebenfalls zu einer Hemmung der Transkription, trotz Anwesenheit des Induktors (Abb. 23 a; Spuren 4–8). Dabei war die Anti-Induktor-Wirkung von Glucose am MD-Promotor sogar noch etwas stärker. Bereits bei 0,50 mM Glucose sank hier die Transkriptionsaktivität auf 0% (Spur 6), während beim TM-Promotor dazu 1,00 mM Glucose nötig waren (vgl. Abb. 20 a). Wie Glucose besitzt auch Maltose am MD-Promotor im Zusammenhang mit TrmB ausgeprägte co-repressive Eigenschaften (Abb. 23 b). Die Maltotriose-induzierte Transkriptionsaktivität sank bei Zugabe von 0,50 mM Maltose auf 6%. Maltose ist somit für TrmB am MD-Promotor ein ebenso starker Anti-Induktor wie Glucose.

Glucose fungiert also im Zusammenhang mit TrmB sowohl für den TM- als auch für den MD-Promotor als Anti-Induktor und sorgt dafür, dass TrmB auch bei Anwesenheit der jeweiligen Induktoren am Promotor gebunden bleibt.

Die Bindeaffinität von TrmB an den jeweiligen Promotoren wird durch Glucose somit verstärkt. Darüber hinaus scheinen Zucker, die für TrmB am TM-Promotor als Induktoren wirken, Anti-Induktoren am MD-Promotor zu sein und umgekehrt. TrmB erkennt demnach nicht nur promotorabhängig verschiedene Zuckersubstrate, sondern zeigt an verschiedenen Promotoren auch eine unterschiedliche Antwort auf ein und dasselbe Substrat.

4. TrmBL1 ist ein Repressor der Glycolyse und autoreguliert seine eigene Expression

Wie bereits in Kap. I, 4. beschrieben, besitzt *P. furiosus* abgesehen von TrmB noch drei weitere Vertreter der TrmB-Familie, die untereinander und mit ähnlichen Regulatoren aus Organismen der *Thermococcales* große Homologien aufweisen. TrmBL1 (PF0124) aus *P. furiosus* besitzt 67% Aminosäure-Sequenzidentität mit dem Regulator Tgr (TK1769) aus *T. kodakaraensis*. Tgr erkennt in seinen Zielpromotoren das Sequenzmotiv TGM (***T***hermococcales ***G***lycolytic ***M***otif) und fungiert promotorabhängig sowohl als Repressor als auch als Aktivator (Kanai *et al.*, 2007). Im Promotorbereich von Genen, welche für Enzyme der Glycolyse kodieren, konnte auch in *P. furiosus* das TGM-Motiv nachgewiesen werden (van de Werken *et al.*, 2006). Aufgrund der großen Homologie zwischen TrmBL1 und Tgr sollte nun untersucht werden, ob TrmBL1 aus *P. furiosus* ebenfalls an das TGM-Motiv bindet und womöglich die Transkription glycolytischer Gene reguliert. In den *in vitro* Experimenten wurde dabei die Promotorregion des PF1784-Gens als Matrize eingesetzt. Dieses kodiert für die Phosphofructokinase (PFK), ein glycolytisches Enzym, welches die ADP-abhängige Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-Bisphosphat katalysiert (vgl. Abb.5).

Viele archaeele Regulatoren wie z.B. LrpA aus *P. furiosus* und Ptr2 aus *M. jannaschii* regulieren die Transkription ihres eigenen Gens (vgl. Tab. 1). Es sollte deshalb mittels *in vitro* Transkriptionsversuchen geprüft werden, ob dies auch bei TrmBL1 der Fall ist und der Regulator die Transkription seines eigenen Gens (PF0124) ebenfalls autoreguliert.

4.1. Die PFK (PF1784)–Promotor–Matrize

Der Phosphofructokinase (PFK)–Promotor mit dem Abfangsbereich des PF1784–Gens wurde über die EcoRI– und HindIII–Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle in den Vektor pUC19 ligiert (Lee *et al.*, 2007b). Mit Hilfe der Primer 3PF1784 und 5PF1784 konnte ein PCR–Produkt einer Länge von 232 bp gewonnen werden, das als Matrize für die *in vitro* Experimente verwendet wurde (Abb. 24).

Der PFK–Promotor besitzt ein TGM–Motiv, das stromabwärts der BRE/TATA–Box zwischen Transkriptions– und Translationsstart lokalisiert ist und sich innerhalb der TrmBL1–Bindestelle befindet (vgl. Kap. III, 4.2.). Die TrmBL1–Bindestelle überlappt den Transkriptionsstart (+1), der bei einem Guanin 18 Nukleotide stromabwärts der BRE/TATA–Box bzw. 27 Nukleotide stromaufwärts des Translationsstarts von PF1784 liegt (Gindner, 2009; van de Werken *et al.*, 2006). Die PFK–Promotor–Matrize lieferte demnach ein run–off Transkript einer Länge von 108 nt.

Auch für den Regulator TrmB besitzt der PFK–Promotor eine Bindestelle. Diese beginnt stromabwärts der BRE/TATA–Box, überlappt die TrmBL1–Bindestelle und erstreckt sich über den Transkriptionsstart bis hin zum Translationsstart (vgl. Kap. III, 5.1.).

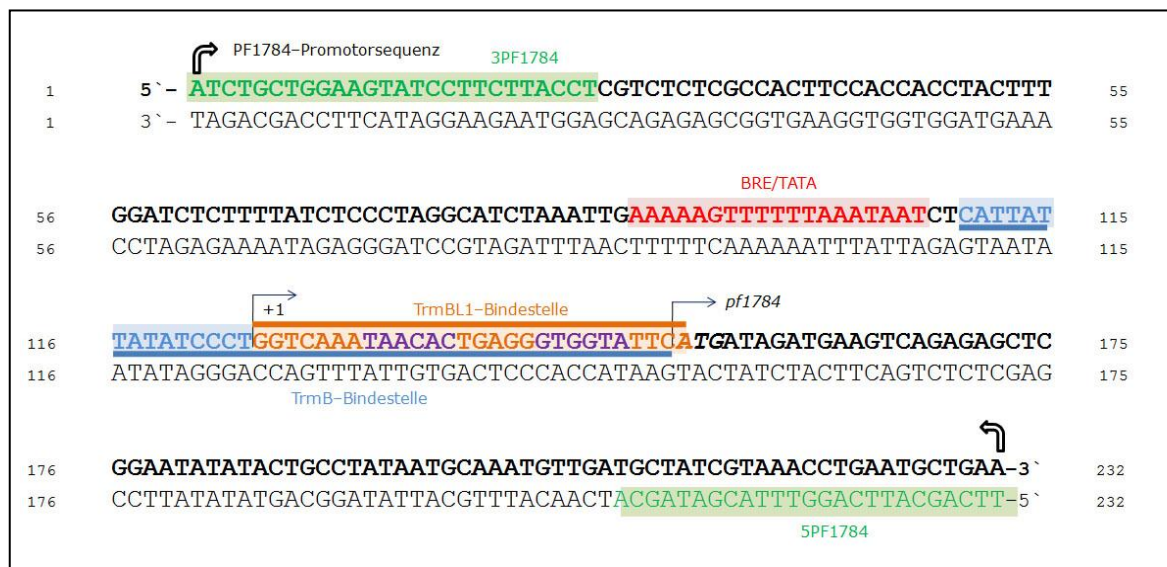


Abb. 24: PFK (PF1784)–Promotor–Matrize.

Die Phosphofructokinase (PFK)–Promotorregion mit dem Anfangsbereich des PF1784–Gens wurde über die EcoRI– und HindIII–Schnittstellen in den Vektor pUC19 kloniert und über PCR mit den Primern 3PF1784 und 5PF1784 (grün dargestellt) amplifiziert. Das so gewonnene PCR–Produkt (Länge: 232 bp) wurde als Matrize in EMSA–, DNaseI Footprinting–, und *in vitro* Transkriptionsversuche eingesetzt.

Die BRE/TATA–Box des PFK–Promotors ist rot dargestellt. Die TrmBL1–Bindestelle ist orange hervorgehoben; die TrmB–Bindestelle ist blau unterstrichen. Das TGM–Motiv ist lila dargestellt. Beide Bindestellen befinden sich im Bereich des Transkriptionsstarts von PF1784 der mit +1 markiert ist.

Für EMSA- und DNaseI Footprinting-Versuche wurde für die PCR-Amplifizierung der Matrize ein [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP markierter 3PF1784 Primer verwendet.

4.2. Bestimmung der TrmBL1-Bindestelle des PFK-Promotors durch DNaseI Footprinting

Die Bestimmung der Bindestelle von TrmBL1 am PFK-Promotor wurde bereits 2007 von Lee *et al.* durchgeführt und im Rahmen dieser Arbeit noch einmal wiederholt und verfeinert (Abb. 25).

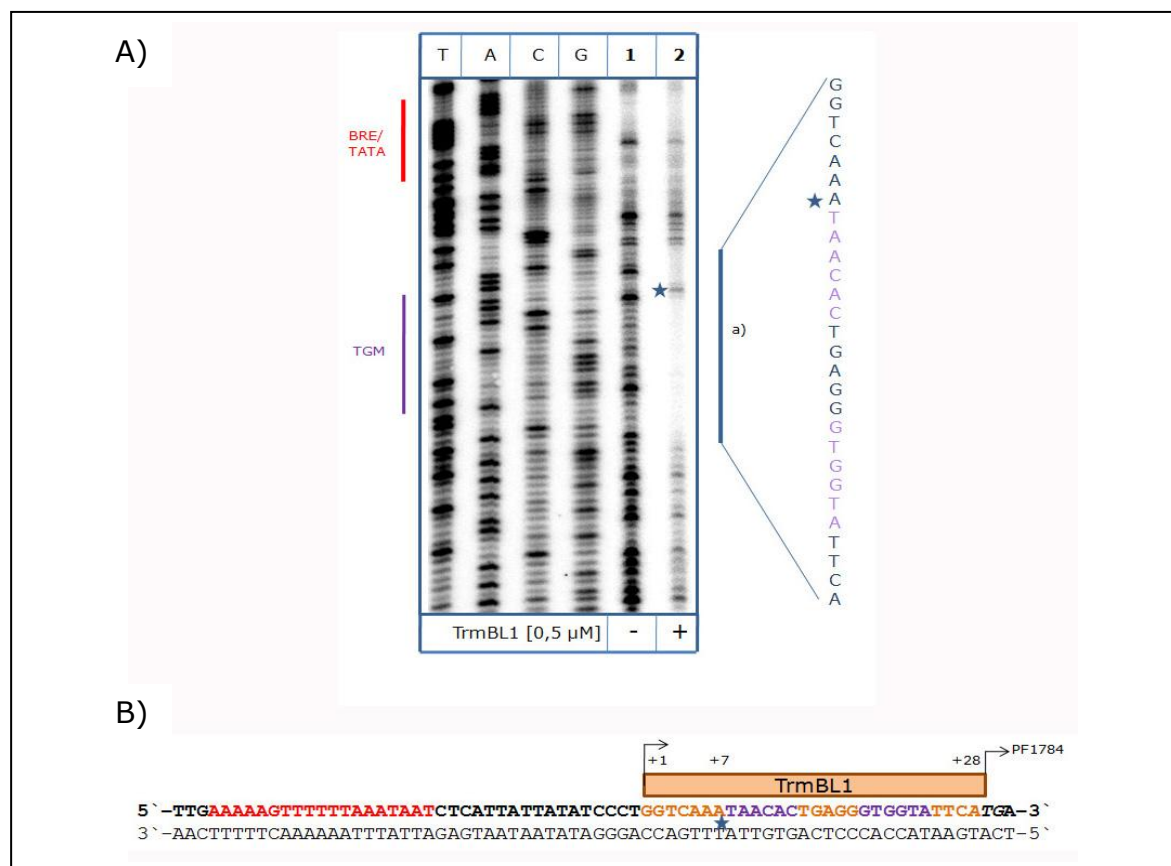


Abb.25: DNaseI Footprinting-Analyse des PFK (PF1784)-Promotors mit TrmBL1

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel; DNaseI Footprinting-Puffer II.

A) Ein DNaseI-Verdau wurde am codierenden Strang des PFK-Promotors in Ab- (1) und Anwesenheit von 0,5 μM TrmBL1 (Spur 2) durchgeführt. a) stellt den Bereich dar, der durch Bindung von TrmBL1 vor dem DNaseI-Verdau geschützt wurde. Der Stern markiert eine hypersensitive Stelle an Position +7. Die mit T, A, C und G markierten Spuren stellen die Sequenzreaktionen dar. Die Position der BRE/TATA-Box ist rot, die des TGM ist lila hervorgehoben. Es kamen pro Ansatz 100 ng PFK-Promotor-Matrize und 0,0025 U (Spur 1) bzw. 0,01 U (Spur 2) DNaseI zum Einsatz.

B) Zusammenfassung der Footprint-Daten. Die Bindestelle von TrmBL1 ist mit einem orangefarbenen Kasten gekennzeichnet. TrmBL1 bindet genau im Bereich zwischen Transkriptions- und Translationsstart bei Position +1 bis +28. Das TGM-Motiv ist lila dargestellt. Die BRE/TATA-Box ist rot hervorgehoben.

Dazu wurde die am 5'-Ende mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP markierte PFK-Promotor-Matrize einem DNaseI verdau unterzogen. Die durch DNaseI-Hydrolyse gewonnenen DNA-Fragmente wurden auf ein Sequenzgel aufgetragen und analysiert (Abb. 25A).

Bei Einsatz von 0,5 μM TrmBL1 (Spur 2) ist im Vergleich zum Ansatz ohne TrmBL1 (Spur 1) ein deutlicher Footprint zu erkennen. Wie der Abgleich mit dem Sequenzstandard der PFK-Promotor-Matrize deutlich macht, wurde die DNA zwischen Position +1 und +28 von TrmBL1 vor dem Abbau durch DNaseI geschützt. Die TrmBL1-Bindestelle des PFK-Promotors besitzt demnach die Nukleotidsequenz „5'-GGTCAAA**TAACACTGAGGGTGGTA**TTCA-3'“ und befindet sich stromabwärts der BRE/TATA-Box direkt in der Region zwischen Transkriptionsstart (+1) und Translationsstart (+28) des PF1784-Gens (vgl. Abb. 25B). Das TGM-Motiv (Fettdruck) ist ebenfalls innerhalb der TrmBL1-Bindestelle lokalisiert und scheint somit wie für Tgr aus *T. kodakaraensis* auch für TrmBL1 aus *P. furiosus* das Bindemotiv zu sein. An Position +7, direkt am Beginn des TGM-Motivs, konnte außerdem eine hypersensitive Stelle nachgewiesen werden. In Abb. 25B sind die Footprint-Daten für TrmBL1 am PFK-Promotor noch einmal zusammengefasst.

4.3. TrmBL1 hemmt die Transkription am PFK-Promotor

Durch DNaseI Footprinting-Versuche konnte nachgewiesen werden, dass TrmBL1 im Bereich des TGM-Motivs an den PFK-Promotor bindet (vgl. Kap. III, 4.2.). Im Folgenden sollte mit *in vitro* Transkriptionsversuchen untersucht werden, inwiefern die Transkription am PFK-Promotor durch die Bindung von TrmBL1 beeinflusst wird. Dazu wurden steigende Konzentrationen TrmBL1 (0,25–1,75 μM) in entsprechende Transkriptionsansätze mit der PFK-Promotor-Matrize gegeben (Abb. 26A). Im Vergleich zur basalen Transkription war bereits bei 0,25 μM TrmBL1 eine Reduktion der Transkriptionsaktivität um 51% festzustellen (Spur 2). Bis 1,75 μM TrmBL1 sank die Signalstärke auf 4% (Spur 8).

TrmBL1 fungiert am PFK-Promotor demnach als Repressor und inhibiert die Transkription von Genen glycolytischer Enzyme. Damit besitzt TrmBL1 in *P. furiosus* dieselbe Funktion wie Tgr in *T. kodakaraensis* und wirkt als Repressor der Glycolyse. Da sich die Bindestelle von TrmBL1 am PFK-Promotor im Bereich des Transkriptionsstarts befindet, wird bei Bindung des Regulators höchstwahrscheinlich die Rekrutierung der RNA-Polymerase verhindert und die Transkription somit gehemmt.

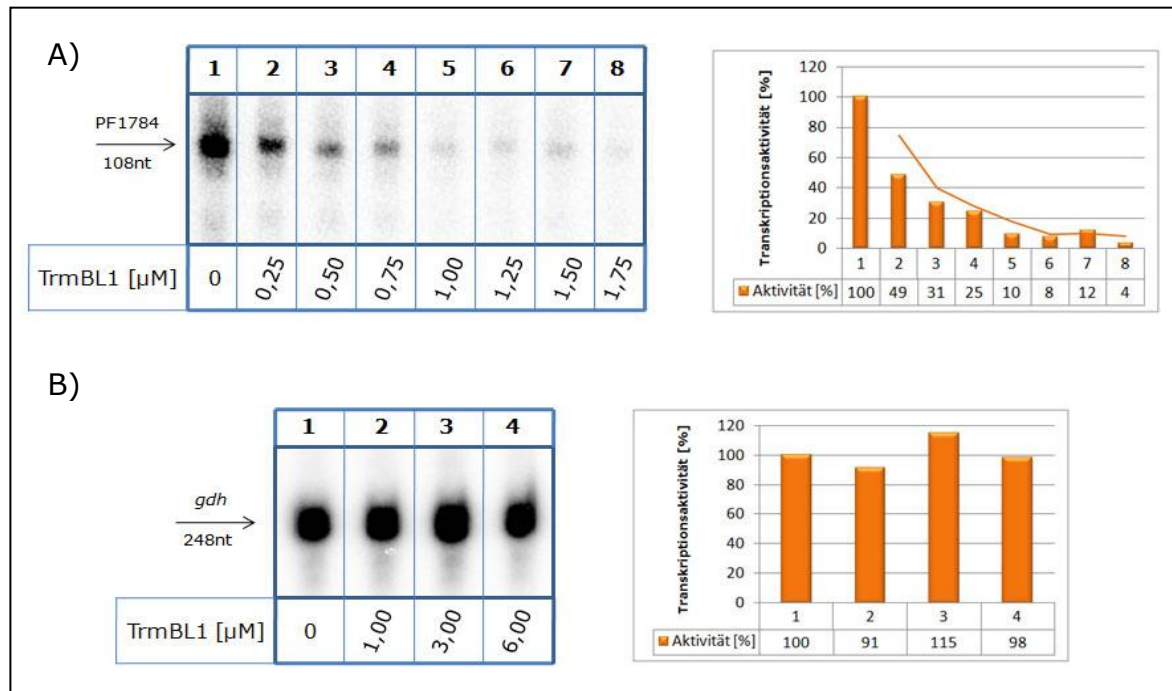


Abb. 26: *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmBL1 am PFK-Promotor.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer II.

Unter A) ist der Effekt von steigenden Konzentrationen TrmBL1 (0,25–1,75 μ M) auf die Transkription am PFK-Promotor (Spuren 2–8) zu sehen. Spur 1 stellt die Kontrolle ohne TrmBL1 dar. Ab einer Konzentration von 1,00 μ M TrmBL1 wird die Transkription nahezu vollständig gehemmt. Die Kontrolle mit dem *gdh*-Promotor (B) macht deutlich, dass TrmBL1 spezifisch an den PFK-Promotor bindet.

Pro Ansatz kamen 150 fmol PFK-Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Quantifizierungen sind in den Diagrammen rechts dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

Um auszuschließen, dass die beobachtete Repressor-Wirkung von TrmBL1 am PFK-Promotor womöglich auf eine unspezifische Bindung des Regulators an die DNA zurückzuführen ist, wurden Kontrolltranskriptionen am Promotor der **G**lutamat-**D**ehydrogenase (*gdh*) mit 1,00–6,00 μ M TrmBL1 durchgeführt. Der *gdh*-Promotor gehört nicht zu den Zielpromotoren von Regulatoren der TrmB-Familie und dürfte somit auch nicht von TrmBL1 gehemmt werden. In Abb. 26B ist zu sehen, dass auch 6,00 μ M TrmBL1 die Transkription am *gdh*-Promotor nicht inhibierten (Aktivität=98%; Spur 4). Damit kann eine unspezifische Bindung von TrmBL1 ausgeschlossen werden.

4.4. Maltose, Maltotriose und Fructose sind Induktoren für TrmBL1 am PFK-Promotor

Nachdem festgestellt werden konnte, dass TrmBL1 am PFK-Promotor als Repressor wirkt, stellte sich nun die Frage nach möglichen Induktoren, welche die TrmBL1-vermittelte Hemmung wieder aufheben und die Transkription am PFK-Promotor initiieren können. Es wurden deshalb verschiedene Zucker in *in vitro* Transkriptionsversuchen mit TrmBL1 an der PFK-Promotor-Matrize getestet.

Auf Abb. 27A sind die entsprechenden Autoradiogramme mit Maltose (a), Maltotriose (b), Fructose (c) und Glucose (d) zu sehen. Maltose, Maltotriose und Fructose zeigten einen sehr deutlichen Induktor-Effekt und konnten die durch 1,0 μM TrmBL1 verursachte Transkriptionshemmung am PFK-Promotor wieder rückgängig machen. Glucose war dagegen nur ein sehr schwacher Effektor, zeigte aber dennoch eine leichte Induktor-Wirkung. Bei allen vier Substraten ist auffällig, dass die TrmBL1-vermittelte Hemmung der Transkription am PFK-Promotor nicht kontinuierlich mit steigenden Zuckerkonzentrationen aufgehoben wurde, wie dies z.B. bei TrmB am TM- und MD-Promotor zu beobachten war (vgl. Kap. III, 1.5.). Der Induktor-Effekt folgte hier vielmehr einem konzentrationsabhängigen, wellenförmigen Muster. So stieg die Transkriptionsrate bei Zugabe von 0,25 mM Maltose auf 58% an (Spur 5), um dann bei Konzentrationen zwischen 0,50 und 1,00 mM Maltose wieder auf unter 30% abzusinken (Spuren 6 und 7). Bei höheren Maltose-Konzentrationen nahm die Aktivität erneut zu und erreichte bei 10,00 mM Maltose ein Maximum von 74% (Spur 10), um danach wieder abzufallen.

Dasselbe wellenförmige Induktionsmuster war auch bei Zugabe von steigenden Mengen Maltotriose zu beobachten. Bei 0,10 bzw. 0,25 mM Maltotriose stieg die Transkriptionsaktivität auf 39 bzw. 36% an (Spuren 4 und 5), um bei höheren Konzentrationen wieder auf bis zu 10% bei 2,50 mM Maltotriose abzusinken (Spur 8). Bei 10,00 mM Maltotriose erhielt man dann auch hier einen weiteren Aktivitätspeak von 49% (Spur 10), der bei 15,00 mM wieder auf 2% abfiel (Spur 11).

Dasselbe war auch bei Fructose der Fall. Hier gab es bei 0,10 bzw. 15,00 mM Fructose jeweils ein Aktivitätsmaximum von 40% (Spur 4) bzw. 45% (Spur 11). Fructose ist damit ein ähnlich starker Induktor wie Maltotriose.

Bei Glucose war der Induktor-Effekt insgesamt nur sehr schwach. Dennoch war auch hier ein ähnliches Wellenmuster nachzuweisen. Bei 0,25 mM Glucose stieg die

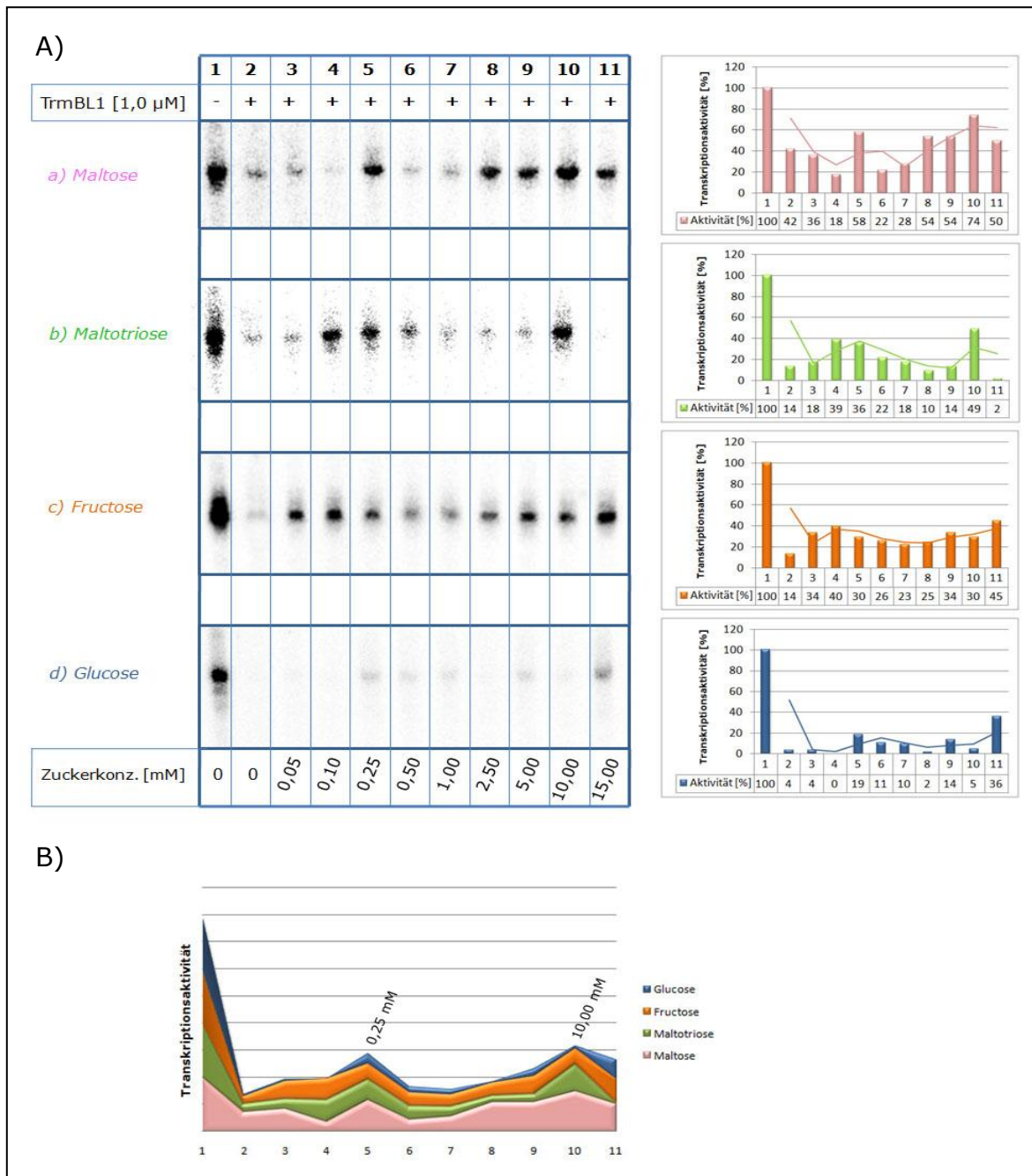


Abb. 27: *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmBL1 am PFK-Promotor in Anwesenheit verschiedener Zucker.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer II.

Unter A) ist der Effekt von steigenden Konzentrationen (0,05–15,00 mM) Maltose (a), Maltotriose (b), Fructose (c) und Glucose (d) auf die Transkription am PFK-Promotor in Anwesenheit von 1,0 µM TrmBL1 (Spuren 3–11) zu sehen. Die Spuren 1 und 2 stellen die Kontrollen ohne und mit TrmBL1 in Abwesenheit von Zuckern dar. Alle getesteten Zucker verursachten einen Induktor-Effekt, der nicht konstant, sondern wellenförmig anstieg. Pro Ansatz kamen 150 fmol PFK-Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Länge des Transkripts betrug 108nt. Die Quantifizierungen mit Trendlinien sind in den Diagrammen rechts dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

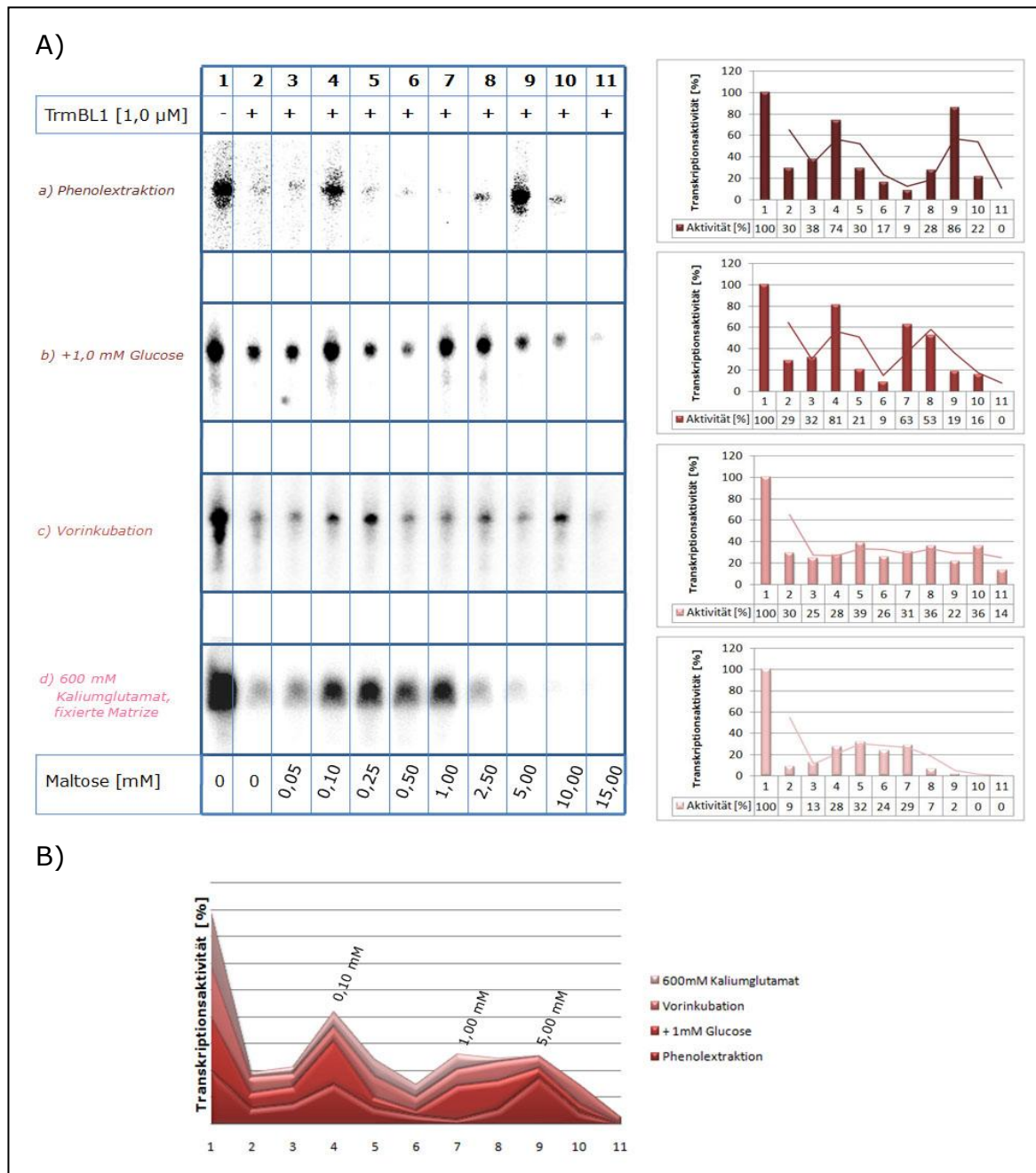
B) Graphische Darstellung des Verteilungstrends der Ergebnisse aus A). Der Induktor-Effekt der getesteten Zucker folgt einem konzentrationsabhängigen, wellenförmigen Muster mit jeweils einem Aktivitätspeak bei 0,25 und 10,00 mM Zucker.

Transkriptionsaktivität auf 19% (Spur 5), fiel dann wieder ab und erreichte bei 15,00 mM Glucose mit 36% ein weiteres Maximum (Spur 11). In Abb. 27B ist eine graphische Darstellung des Verteilungstrends der Ergebnisse aus Abb. 27A zu sehen. Der Induktor-Effekt aller vier getesteten Zucker folgt demnach einem konzentrationsabhängigen, wellenförmigen Muster mit jeweils einem Aktivitätspeak bei 0,25 mM und 10,00 mM Zucker. Es war zunächst unklar, ob es sich bei dem beobachteten Phänomen tatsächlich um einen relevanten Effekt der getesteten Zucker im Zusammenhang mit TrmBL1 handelte, oder ob man es womöglich mit einem Nebeneffekt der Versuchsbedingungen *in vitro* zu tun hatte. Die Ansätze mit Maltose wurden deshalb noch einmal unter verschiedenen Versuchsbedingungen wiederholt (Abb. 28).

Um eine Beeinträchtigung des Ergebnisses durch Verunreinigungen auszuschließen, wurde in der ersten Versuchsreihe mit Maltose vor der Gelelektrophorese eine Phenolextraktion mit allen Ansätzen durchgeführt. Wie in Abb. 28A a) zu sehen ist, blieb das Wellenmuster jedoch erhalten und man konnte zwei noch deutlicher ausgeprägte Aktivitätsmaxima von 74% bzw. 86% bei 0,10 bzw. 5,00 mM Maltose erkennen (Spur 4 bzw. 9).

In der zweiten Versuchsreihe wurde zusätzlich zu den steigenden Mengen Maltose 1,0 mM Glucose zugegeben, um zu überprüfen, ob die Anwesenheit von Glucose den Induktor-Effekt von Maltose womöglich stabilisieren könnte (Abb. 28A b). Doch auch hier ergab sich wieder ein konzentrationsabhängiges Wellenmuster mit einem Aktivitätsmaximum von 81% bei 0,10 mM Maltose (Spur 4) und einem weiteren Maximum von 63%, das allerdings im Vergleich zu Abb. 27A a) etwas nach vorne verschoben war und bereits bei 1,00 mM Maltose auftrat (Spur 7).

Um eine Destabilisierung des Systems durch längere Inkubation bei hohen Temperaturen und eine damit verbundene Beeinflussung der Transkription zu vermeiden, wurde in der Versuchsreihe unter Abb. 28A c) zunächst eine Vorinkubation für fünf Minuten bei 60°C in Anwesenheit von RNA-Polymerase und Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Anschließend wurde die Transkription durch Zugabe des TP-Mixes mit [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP gestartet. Die Inkubationszeit bei 80°C wurde dabei von 30 auf 5 Minuten herabgesetzt. Doch auch hier war auf dem Autoradiogramm wieder derselbe wellenförmige Effekt zu erkennen, wenn auch insgesamt nicht so ausgeprägt. Aktivitätsmaxima von 39 bzw. 36% sind bei 0,25 bzw. 2,50 und 10,00 mM Maltose zu verzeichnen (Spur 5 bzw. 8 und 10).



Bisher wurden die *in vitro* Transkriptionsversuche nach dem zellfreien Transkriptionssystem nach Hethke *et al.* (1996) durchgeführt. Dabei kam ein Transkriptionspuffer zum Einsatz, der 250 mM KCl bzw. NaCl enthielt. Dies entspricht jedoch nicht den physiologischen Bedingungen von *P. furiosus in vivo*. Da höhere Konzentrationen an Cl^- die Transkription aber hemmen (Hethke *et al.*, 1999), konnten keine größeren Mengen an KCl bzw. NaCl eingesetzt werden. In der letzten Versuchsreihe mit Maltose sollten die Pufferbedingungen deshalb so weit wie möglich an die intrazelluläre Ionenkonzentration in *P. furiosus* angepasst werden. Anstatt KCl oder NaCl wurden in den Transkriptionsansätzen 600 mM Kaliumglutamat verwendet. Des Weiteren kam eine immobilisierte PFK-Promotor-Matrize zum Einsatz, die über Streptavidin-Biotin-Bindung an Magnetpartikel fixiert wurde. Da bei der Verwendung einer fixierten Matrize im Vergleich zur nicht fixierten eine höhere TrmBL1-Konzentration zur Transkriptionshemmung nötig war, wurden hier in Ansatz 2-11 2,0 μM statt 1,0 μM TrmBL1 eingesetzt. Wie Abb. 28A zeigt, lieferte die Transkription mit 600 mM Kaliumglutamat zwar insgesamt stärkere Signale, das Phänomen blieb aber auch diesmal erhalten. Das Wellenmuster hatte sich hier jedoch auf ein breiteres Aktivitätsmaximum von um die 30% in einem Konzentrationsbereich von 0,10 bis 1,00 mM Maltose reduziert. Bei höheren Maltose-Konzentrationen gab es kein zweites Maximum und die Aktivität blieb bei 0%.

Auf der graphischen Darstellung des Verteilungstrends der Versuchsreihen mit Maltose unter Abb. 28B) ist weiterhin ein wellenförmiges Induktionsmuster zu sehen. Allerdings haben sich die Aktivitätsmaxima bei Maltose im vgl. zu Abb. 27A a) nach vorne verschoben mit einem starken Peak bei 0,10 mM und zwei schwächeren Peaks bei 1,00 mM und 5,00 mM Maltose. Der beobachtete, wellenförmige Effekt bei der Induktion der Transkription am PFK-Promotor durch Maltose, Maltotriose, Fructose und Glucose scheint daher nicht von den Versuchsbedingungen verursacht zu werden, sondern in direktem Zusammenhang mit der Regulation durch TrmBL1 zu stehen.

4.5. TrmBL1 autoreguliert seine eigene Expression

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob TrmBL1 auch an seinen eigenen Promotor bindet und seine Expression autoreguliert. Dazu wurde der TrmBL1-Promotor mit dem Anfangsbereich des PF0124-Gens über die EcoRI- und HindIII-Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle in den Vektor pUC19 ligiert (Lee *et al.*, 2007b). Durch Verwendung der Primer M13/pUC F und M13/pUC R konnte ein PCR-Produkt einer Länge von 344 bp gewonnen werden, das als Matrize für die *in vitro* Experimente diente (Abb. 29). Der Transkriptionsstart +1 wird bei einem Guanin 21 Nukleotide stromabwärts der BRE/TATA-Box bzw. 38 Nukleotide stromaufwärts des Translationsstarts von PF0124 vermutet. Die TrmBL1-Promotor-Matrize lieferte demnach ein run-off Transkript einer Länge von 180 nt.

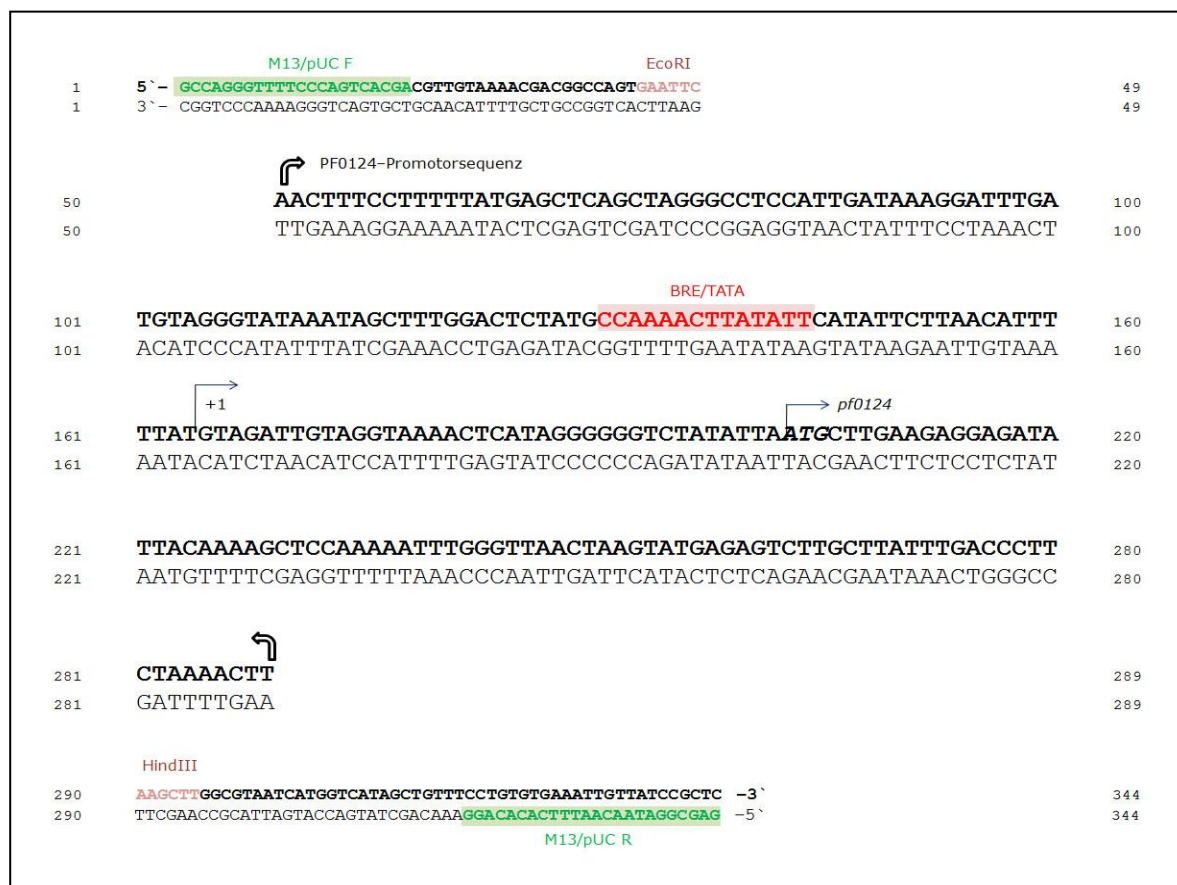


Abb. 29: TrmBL1 (PF0124)-Promotor-Matrize.

Die TrmBL1-Promotorregion mit dem Anfangsbereich des PF0124-Gens wurde über die EcoRI- und HindIII-Schnittstellen (rosa dargestellt) in den Vektor pUC19 kloniert und über PCR mit den Primern M13/pUC F und M13/pUC R (grün dargestellt) amplifiziert. Das so gewonnene PCR-Produkt (Länge: 344 bp) wurde als Matrize in EMSA-, DNaseI Footprinting-, und *in vitro* Transkriptionsversuchen eingesetzt. Die BRE/TATA-Box ist rot dargestellt. Die TrmBL1-Bindestelle ist bis dato unbekannt. Ein TGM-Motiv ist nicht vorhanden. Der mutmaßliche Transkriptionsstart ist mit +1 markiert.

EMSA-Versuche mit TrmBL1 an der TrmBL1-Promotor-Matrize belegten, dass der Regulator an seinen eigenen Promotor binden kann, obwohl das TGM-Motiv hier fehlt (Lee *et al.*, 2007b). Die genaue Bindestelle von TrmBL1 ist jedoch nicht bekannt, da entsprechende DNaseI Footprinting Experimente bisher fehlgeschlagen sind. Mit Hilfe von *in vitro* Transkriptionsversuchen sollte nun festgestellt werden, ob TrmBL1 die Transkription am TrmBL1-Promotor reguliert.

Dazu wurden in die entsprechenden Ansätze mit der TrmBL1-Promotor-Matrize steigende Mengen TrmBL1 (0,25–1,75 μM) zugeben. Wie in Abb. 30 zu sehen ist, hemmten bereits 0,25 μM TrmBL1 die Transkription deutlich. Im Vergleich zur basalen Transkription sank die Aktivität hier um 48% (Spur 2). Bei höheren TrmBL1-Konzentrationen fiel sie weiter ab und erreichte bei 1,75 μM TrmBL1 3% (Spur 8).

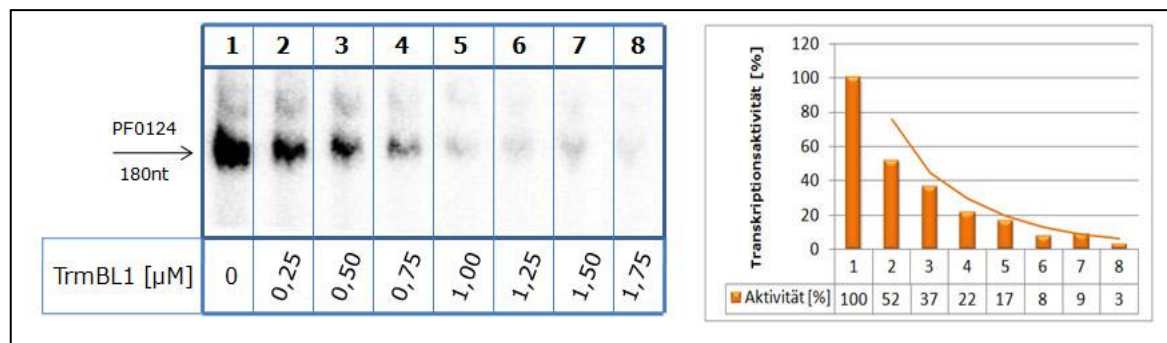


Abb. 30: *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmBL1 am TrmBL1-Promotor.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer II.

Zu sehen ist der Effekt von steigenden Konzentrationen TrmBL1 (0,25–1,75 μM) auf die Transkription am TrmBL1-Promotor (Spuren 2–8). Spur 1 stellt die Kontrolle ohne TrmBL1 dar. Ab einer Konzentration von 1,25 μM TrmBL1 wird die Transkription nahezu vollständig gehemmt.

Pro Ansatz kamen 150 fmol TrmBL1-Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Quantifizierung mit Trendlinie ist im Diagramm rechts dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

Obwohl das TGM-Motiv im TrmBL1-Promotor fehlt, besitzt der Regulator hier eine ähnlich hohe Bindeaffinität wie am PFK-Promotor und hemmt die Transkription seines eigenen Promotors mit einer vergleichbaren Effizienz (vgl. Kap. III, 4.3.). Zu einer nahezu vollständigen Hemmung ist nur eine geringfügig größere Menge Regulator nötig (1,25 μM) als beim PFK-Promotor (1,0 μM). TrmBL1 autoreguliert somit seine eigene Expression auf negative Art und Weise. Die Tatsache, dass TrmBL1 an seinen eigenen Promotor binden kann, belegt außerdem, dass das TGM-Motiv für TrmBL1 zur Promotorerkennung und -bindung nicht essentiell ist.

4.6. Glucose ist ein Induktor für TrmBL1 am TrmBL1-Promotor

Da nun bekannt war, dass TrmBL1 seine eigene Expression negativ autoregulierte, sollte anschließend ermittelt werden, ob es für den Regulator auch am eigenen Promotor Effektoren gibt, welche die Transkription wieder initiieren können. Dazu wurden erneut *in vitro* Transkriptionsversuche am TrmBL1-Promotor mit 1,25 μ M TrmBL1 und steigenden Konzentrationen (0,05–15,00 mM) verschiedener Zucker durchgeführt. Wie in Abb. 31 a) zu sehen ist, hatte Maltose keine Induktor-Wirkung und konnte die TrmBL1-vermittelte Hemmung am TrmBL1-Promotor nicht aufheben. Die Aktivität stieg im Vergleich zur basalen Transkription ohne TrmBL1 (Spur 1) auch bei hohen Maltose-Konzentrationen nicht über 10% (Spuren 3–11).

Glucose besaß dagegen bereits bei geringen Konzentrationen einen deutlichen, Induktor-Effekt (Abb. 31 b). Auch hier trat wieder ein wellenförmiges Induktionsmuster auf, das allerdings schwächer ausfiel als bei den Induktoren am PFK-Promotor (vgl. Kap. III, 4.4).

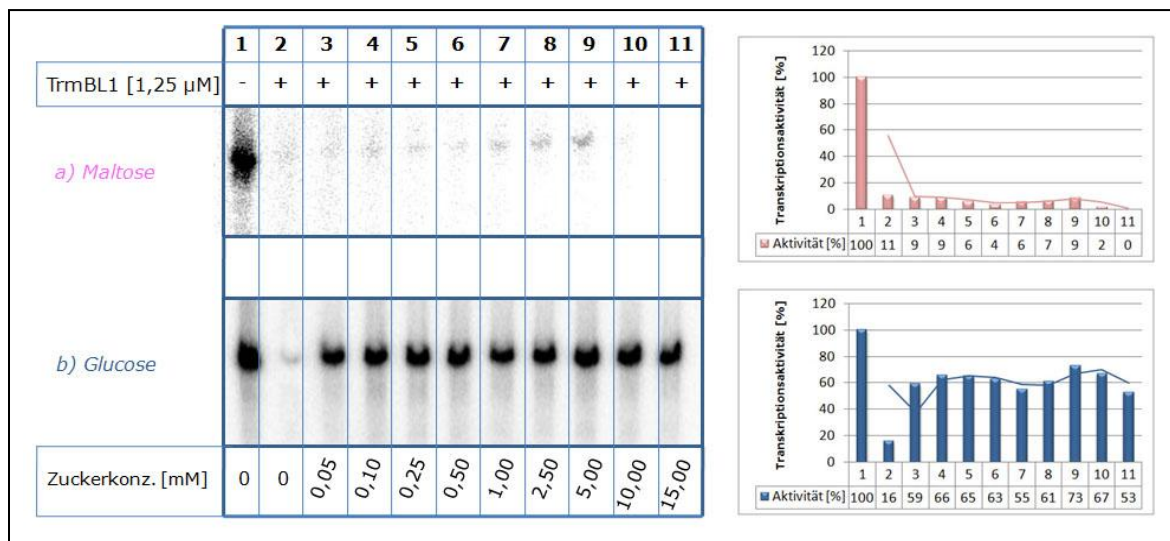


Abb. 31: *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmBL1 am TrmBL1-Promotor in Anwesenheit verschiedener Zucker.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer II.

Zu sehen ist der Effekt von steigenden Konzentrationen (0,05–15,00 mM) a) Maltose bzw. b) Glucose auf die Transkription am TrmBL1-Promotor in Anwesenheit von 1,25 μ M TrmBL1 (Spuren 3–11). Die Spuren 1 und 2 repräsentieren die Kontrollen ohne und mit TrmBL1 in Abwesenheit von Zuckern. Glucose ist ein Induktor für TrmBL1.

Pro Ansatz kamen 150 fmol TrmBL1-Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Länge des Transkripts betrug 180nt. Die Quantifizierungen mit Trendlinien sind in den Diagrammen rechts dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

Jedoch waren auch hier zwei Aktivitätsmaxima auszumachen. Eines lag mit 66% bei 0,10 mM Glucose (Spur 4) und das zweite trat bei 5,00 mM Glucose auf und erreichte 73% (Spur 9).

5. TrmB erkennt die Zielpromotoren von TrmBL1 und umgekehrt

Aufgrund der hohen Aminosäure-Sequenzidentität zwischen TrmB und TrmBL1, die in der N-terminalen DNA-Bindedomäne sogar 45% beträgt (Lee *et al.*, 2007b), sollte nun untersucht werden, ob TrmB womöglich an die Zielpromotoren von TrmBL1 bindet bzw. an der Transkriptionsregulation der jeweiligen Gene beteiligt ist und umgekehrt.

5.1. TrmB reprimiert die Transkription am PFK- und TrmBL1-Promotor

DNaseI Footprinting-Experimente mit TrmB an einer am 5`Ende mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP markierten PFK-Promotor-Matrize (vgl. Kap. III, 4.1.) belegten, dass TrmB eine Bindestelle am PFK-Promotor besitzt. Wie auf Abb. 32A zu sehen ist, trat bei Einsatz von 4,0 μM TrmB (Spur 5) im Vergleich zum Kontrollansatz ohne TrmB (Spur 1) ein deutlicher Footprint auf. Durch einen Abgleich mit dem Sequenzstandard der PFK-Promotor-Matrize ließ sich feststellen, dass TrmB die DNA von Position -15 bis +27 vor dem Abbau durch DNaseI schützt. Die TrmB-Bindestelle am PFK-Promotor besitzt demnach die Nukleotidsequenz „5`-CATTATTATATCCCTGGTCAAATAACA CTGAGGGTGGTATTC -3`“. Damit überlappt sie sowohl den Transkriptionsstart (+1), als auch die TrmBL1-Bindestelle des PFK-Promotors (vgl. Kap. III, 4.2.). In Abb. 32B sind die Footprint-Daten für TrmB am PFK-Promotor noch einmal zusammengefasst. Mit Hilfe von *in vitro* Transkriptionsversuchen sollte nun überprüft werden, inwiefern sich die Bindung von TrmB auf die Transkription am PFK-Promotor auswirkt. Dazu wurden in Transkriptionsansätzen mit der PFK-Promotor-Matrize 0,25 bis 2,00 μM TrmB gegeben (Abb. 33A). Die Transkription am PFK-Promotor wurde dabei ab 1,00 μM TrmB vollständig gehemmt. Im Vergleich zur basalen Transkription (Spur 1) sank die Aktivität hier auf 4% und weniger (Spuren 5–8). Wie TrmBL1 fungiert TrmB somit als Repressor der Transkription am PFK-Promotor und hemmt die Transkription

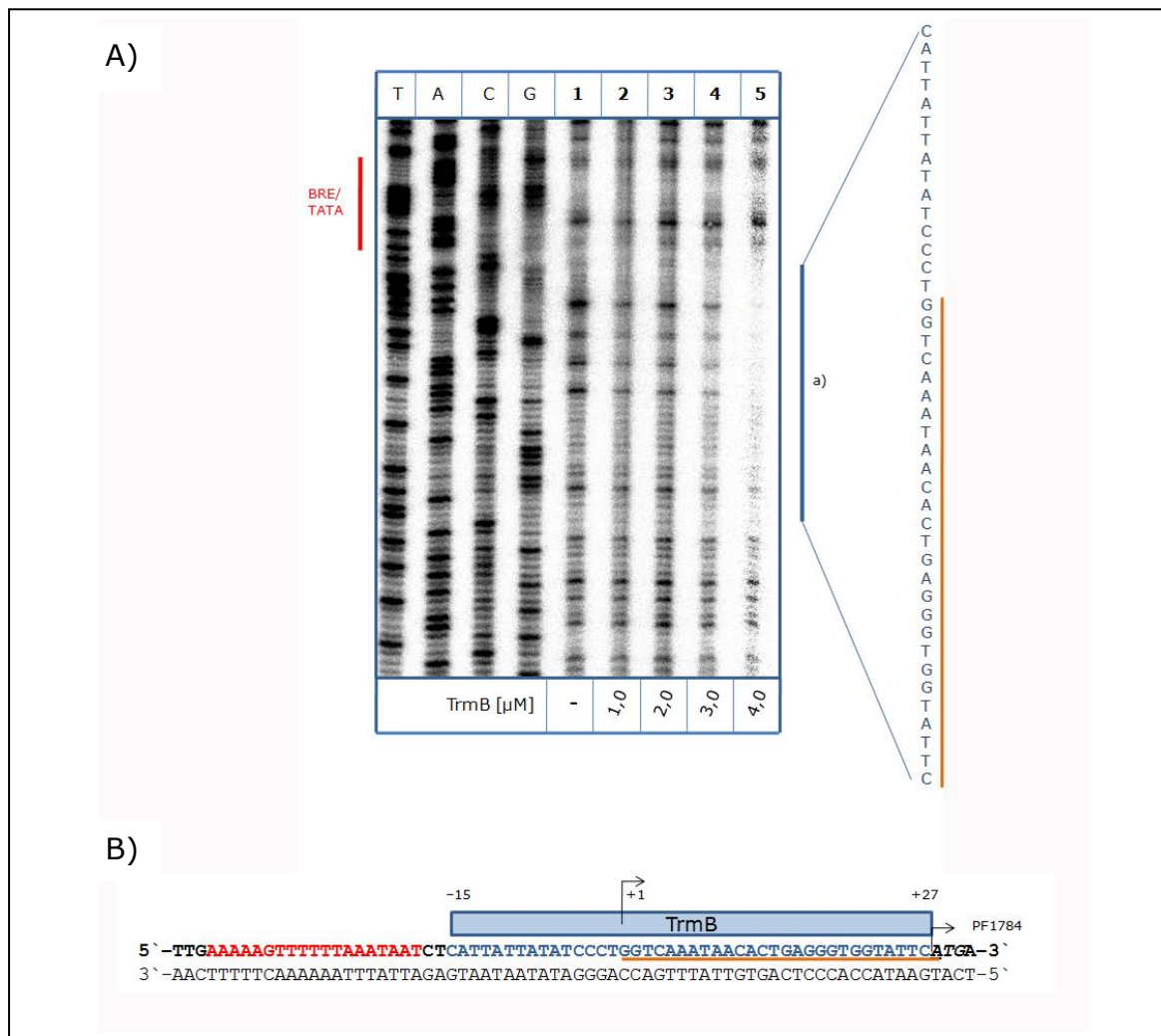


Abb.32: DNaseI Footprinting-Analyse des PFK (PF1784)-Promotors mit TrmB

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel; DNaseI Footprinting-Puffer I.

A) Ein DNaseI-Verdau wurde am codierenden Strang des PFK-Promotors in Ab- (1) und Anwesenheit von 1,0–4,0 μ M TrmB (Spuren 2–5) durchgeführt. a) stellt den Bereich dar, der durch Bindung von TrmB vor dem DNaseI-Verdau geschützt wurde. Die mit T, A, C und G markierten Spuren repräsentieren die Sequenzreaktionen. Die Position der BRE/TATA-Box ist rot hervorgehoben. Es kamen pro Ansatz 100 ng PFK-Promotor-Matrize und 0,0025 U (Spur 1), 0,01 U (Spur 2) bzw. 0,02 U DNaseI (Spuren 3–5) zum Einsatz.

B) Zusammenfassung der Footprint-Daten. Die Bindestelle von TrmB ist mit einem blauen Kasten gekennzeichnet. TrmB bindet zwischen Position -15 und +27. Die TrmBL1-Bindestelle ist orange unterstrichen. Die BRE/TATA-Box ist rot hervorgehoben.

dort mit derselben Effizienz wie TrmBL1 (vollständige Hemmung bei 1,00 μ M TrmB bzw. TrmBL1; vgl. Kap. III, 4.3). Die Position der TrmB-Bindestelle (Abb. 32) lässt vermuten, dass TrmB bei Bindung an den PFK-Promotor die Rekrutierung der RNAP verhindert und die Transkription somit gehemmt wird.

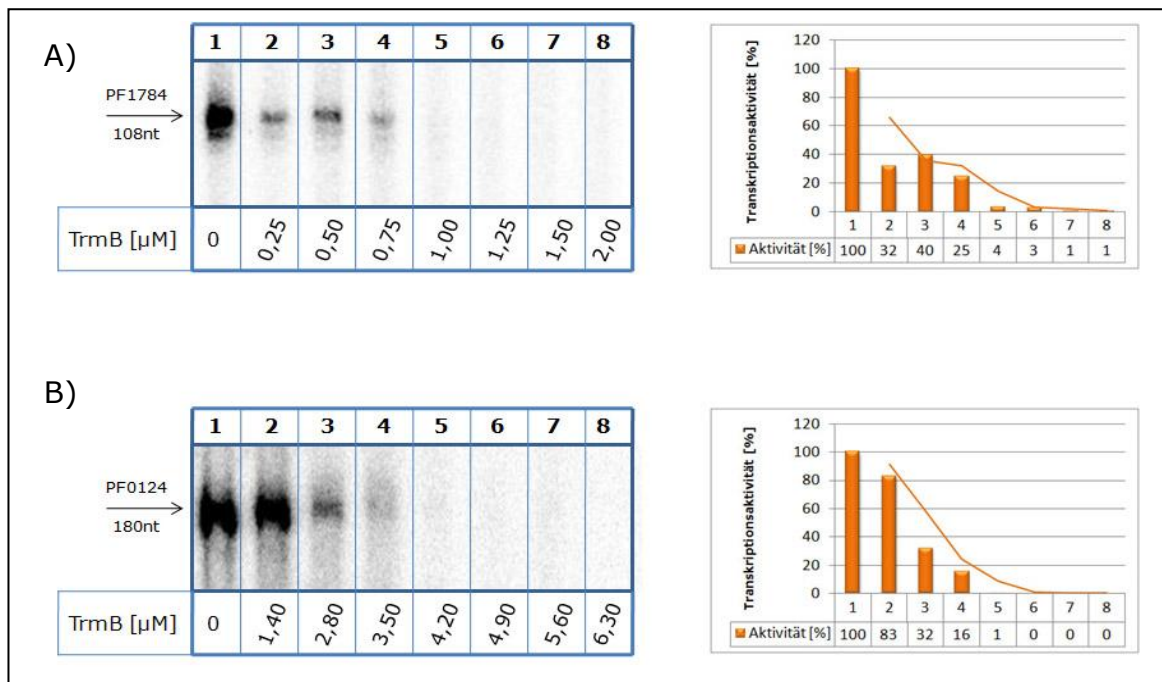


Abb. 33: *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmB an den Zielpromotoren von TrmBL1.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer II (A) bzw. I (B).

Zu sehen ist der Effekt von steigenden Konzentrationen TrmB (0,25–2,00 μ M bzw. 1,40–6,30 μ M) auf die Transkription am A) PFK-Promotor und am B) TrmBL1-Promotor (jeweils Spuren 2–8). Spur 1 stellt jeweils die Kontrolle ohne Regulator dar. TrmB inhibiert die Transkription an beiden Promotoren.

Pro Ansatz kamen 150 fmol Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Quantifizierungen mit Trendlinien sind in den Diagrammen rechts dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

EMSA-Experimente mit TrmB am TrmBL1-Promotor machten deutlich, dass TrmB auch an diesen Promotor binden kann und einen Shift verursacht (Lee *et al.*, 2007b). *In vitro* Transkriptionsversuche mit steigenden Konzentrationen TrmB (1,40–6,30 μ M) sollten deshalb aufklären, ob dieser Regulator die Transkription des TrmBL1-Promotors ebenfalls kontrolliert. Auf dem Autoradiogramm in Abb. 33B ist zu sehen, dass TrmB auch die Transkription am TrmBL1-Promotor reprimierte. Die Aktivität sank im Vergleich zur basalen Transkription (Spur 1) bei Zugabe von 3,50 μ M TrmB auf unter 20% ab (Spur 4) und erreichte bei 4,20 μ M TrmB 1% (Spur 5). Damit ist TrmB ebenso wie TrmBL1 ein Repressor für die Transkription am TrmBL1-Promotor. Da für eine vollständige Hemmung jedoch relativ hohe Konzentrationen TrmB nötig sind, dürfte die Regulation durch TrmB am TrmBL1-Promotor *in vivo* keine große Rolle spielen. Als nächstes sollte untersucht werden, ob es auch für TrmB am PFK- bzw. TrmBL1-Promotor Induktoren gibt, welche die TrmB-vermittelte Transkriptionshemmung wieder aufheben können. In Abb. 34 sind Transkriptionsansätze am PFK-Promotor mit 1,0 μ M TrmB und 0,05 bis 15,00 mM

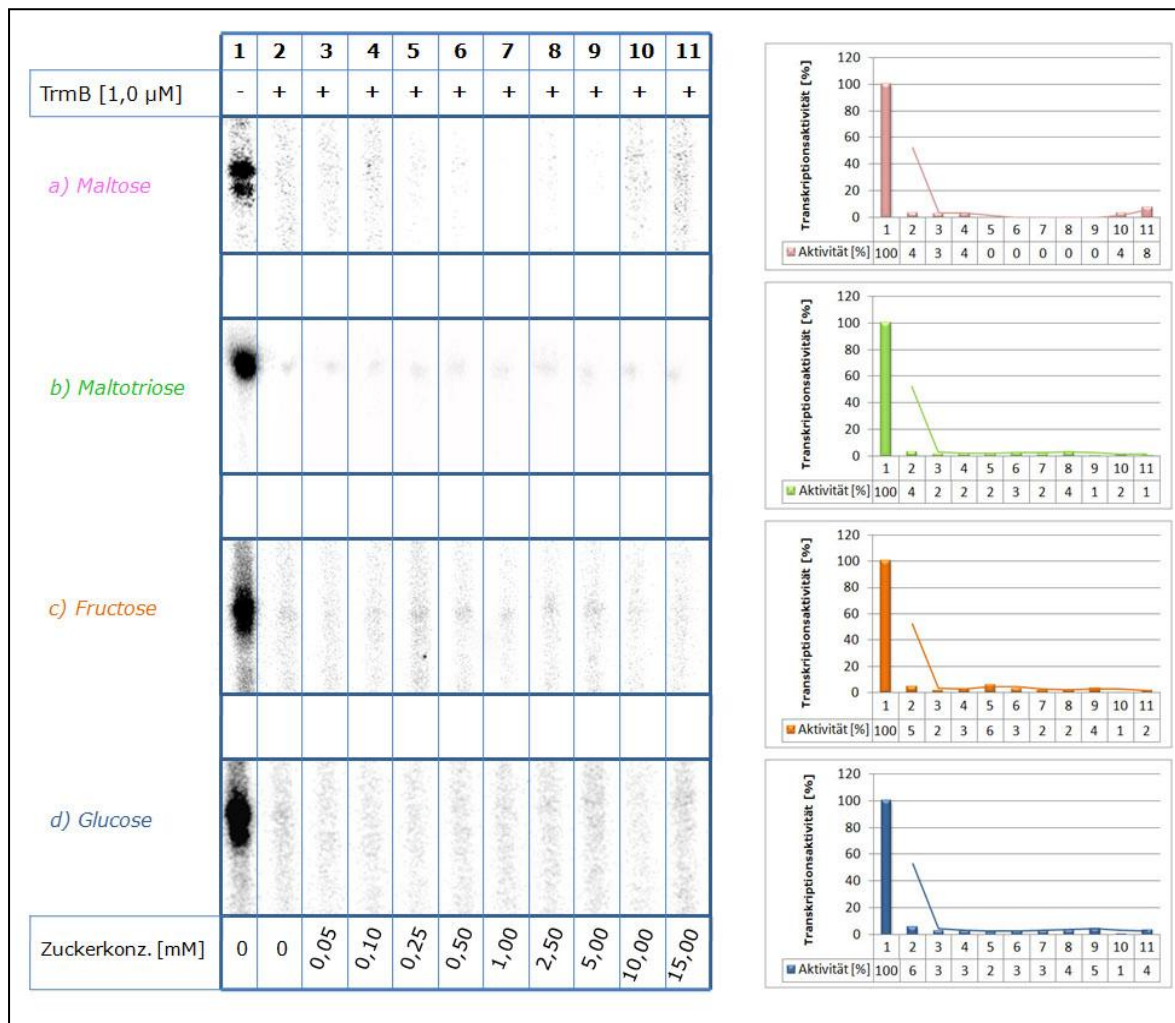


Abb. 34: *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmB am PFK-Promotor in Anwesenheit verschiedener Zucker.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer II.

Zu sehen ist der Effekt von steigenden Konzentrationen (0,05–15,00 mM) Maltose (a), Maltotriose (b), Fructose (c) bzw. Glucose (d) auf die Transkription am PFK-Promotor in Anwesenheit von 1,0 μ M TrmB (Spuren 3–11). Die Spuren 1 und 2 repräsentieren die Kontrollen ohne und mit TrmB in Abwesenheit von Zuckern. Keiner der Zucker ist ein Induktor für TrmB am PFK-Promotor.

Pro Ansatz kamen 150 fmol PFK-Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Länge des Transkripts betrug 108nt. Die Quantifizierungen mit Trendlinien sind in den Diagrammen rechts dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

a) Maltose, b) Maltotriose c), Fructose bzw. d) Glucose (Spuren 3–11) dargestellt. Keiner der getesteten Zucker war in der Lage, die TrmB-vermittelte Hemmung der Transkription am PFK-Promotor rückgängig zu machen. Im Vergleich zur basalen Transkription (Spur 1) blieb die Aktivität in allen Fällen auch bei Zugabe von 15,00 mM Zucker unter 10% (Spur 11).

Am TrmBL1-Promotor wurden entsprechende Ansätze mit a) Maltose, b) Maltotriose und c) Glucose durchgeführt (Abb. 35). Auch hier konnte keiner der getesteten

Zucker die durch 4,2 μ M TrmB verursachte Hemmung der Transkription aufheben (Spuren 3–11). Lediglich bei Glucose konnte im Vergleich zur basalen Transkription (Spur 1) ein leichter Aktivitätsanstieg auf 19% bei 0,10 mM Glucose beobachtet werden (Spur 4), der aber bei höheren Glucose-Konzentrationen wieder auf unter 10% abfiel (Spuren 5–11). Bei Maltose und Maltotriose blieb die Aktivität bei allen getesteten Konzentrationen unter 10% (Spuren 3–11).

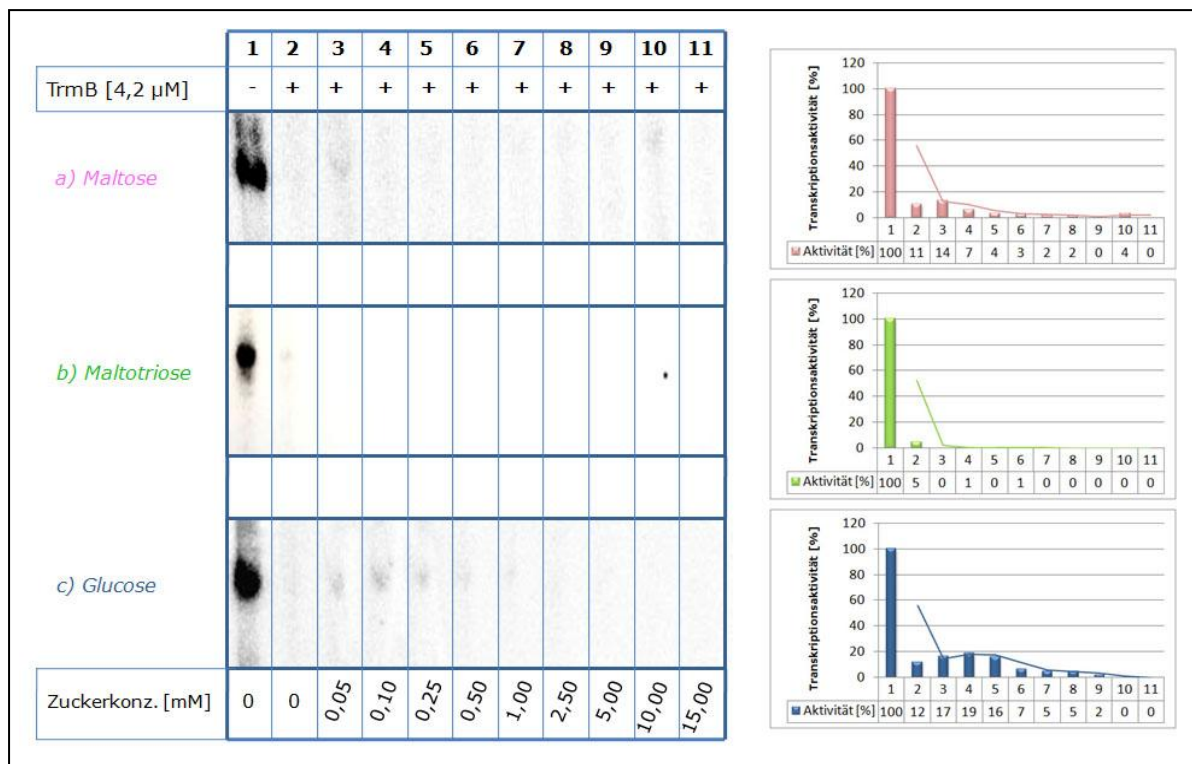


Abb. 35: *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmB am TrmBL1-Promotor in Anwesenheit verschiedener Zucker.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer I.

Zu sehen ist der Effekt von steigenden Konzentrationen (0,05–15,00 mM) Maltose (a), Maltotriose (b) bzw. Glucose (c) auf die Transkription am TrmBL1-Promotor in Anwesenheit von 4,2 μ M TrmB (Spuren 3–11). Die Spuren 1 und 2 repräsentieren die Kontrollen ohne und mit TrmB in Abwesenheit von Zuckern. Keiner der Zucker ist ein Induktor für TrmB am TrmBL1-Promotor.

Pro Ansatz kamen 150 fmol TrmBL1-Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Länge des Transkripts betrug 180nt. Die Quantifizierungen mit Trendlinien sind in den Diagrammen rechts dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

Bisher konnten somit keine Induktoren für TrmB am PFK- und TrmBL1-Promotor ausfindig gemacht werden. Zucker, die üblicherweise von TrmB erkannt werden (Maltose, Maltodextrine), haben hier auch bei Einsatz hoher Konzentrationen keinen Einfluss auf die TrmB-vermittelte Hemmung der Transkription.

5.2. TrmBL1 reprimiert die Transkription am MD- und TM-Promotor mit Maltose als Induktor

Da festgestellt werden konnte, dass auch TrmB an den PFK- und TrmBL1-Promotor binden kann und in beiden Fällen als Repressor fungiert, sollte untersucht werden, ob TrmBL1 auch an die Zielpromotoren von TrmB bindet und dort die Transkription mitreguliert. Da der MD-Promotor ebenfalls ein TGM-Motiv besitzt, lag die Vermutung nahe, dass dieser auch zu den Zielpromotoren von TrmBL1 zählen könnte.

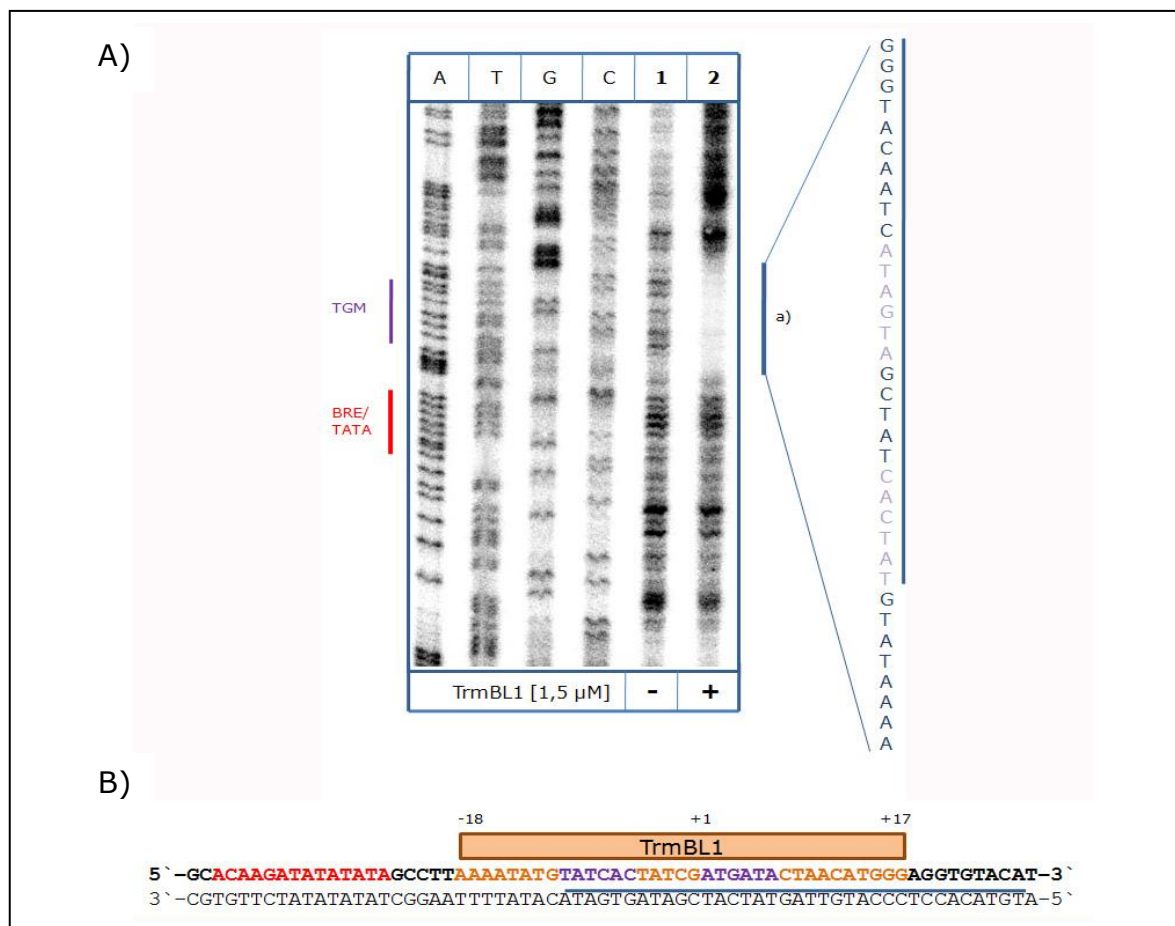


Abb.36: DNaseI Footprinting-Analyse des Maltodextrin (MD)-Promotors mit TrmBL1

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel; DNaseI Footprinting-Puffer I.

A) Ein DNaseI-Verdau wurde am codierenden Strang des MD-Promotors in Ab- (1) und Anwesenheit (2) von 1,5 μ M TrmBL1 durchgeführt. a) stellt den Bereich dar, der durch Bindung von TrmBL1 vor dem DNaseI-Verdau geschützt wurde. Die mit A, T, G und C markierten Spuren repräsentieren die Sequenzreaktionen. Die Position der BRE/TATA-Box ist rot, die des TGM ist lila hervorgehoben. Es kamen pro Ansatz 100 ng MD-Promotor-Matrize und 0,005 U (Spur 1) bzw. 0,01 U (Spur 2) DNaseI zum Einsatz.

B) Zusammenfassung der Footprint-Daten. Die Bindestelle von TrmBL1 ist mit einem orangefarbenen Kasten gekennzeichnet. TrmBL1 bindet im Bereich des Transkriptionsstarts (+1) zwischen Position -18 und +17. Die TrmB-Bindestelle ist blau unterstrichen. Das TGM-Motiv ist lila hervorgehoben. Die BRE/TATA-Box ist rot markiert.

In EMSA-Versuchen mit dem MD-Promotor verursachte TrmBL1 einen starken Shift und besaß mit einem K_D -Wert von $0,2 \mu\text{M}$ eine hohe Bindeaffinität (Lee *et al.*, 2007b). Die TrmBL1-Bindestelle am codierenden Strang wurde durch DNaseI Footprinting-Experimente mit einer am 5'-Ende mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP markierten MD-Promotor-Matrize bereits 2007 von Lee *et al.* ermittelt und im Rahmen dieser Arbeit noch einmal genauer bestimmt. Im Autoradiogramm in Abb. 36A ist im Ansatz mit $1,5 \mu\text{M}$ TrmBL1 (Spur 2) im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Regulator (Spur 1) ein deutlicher Footprint zu erkennen. Durch einen Abgleich mit dem Sequenzstandard konnte die TrmBL1-Bindestelle lokalisiert werden. Die DNA wurde stromabwärts der BRE/TATA-Box zwischen Position -18 und +17 von TrmBL1 vor dem Abbau durch DNaseI geschützt. Die TrmBL1-Bindestelle besitzt demnach die Nukleotidsequenz „5'-AAAATATG**TATCACTATCGATGATA**CTAACATGGG-3'“ und überlappt den Transkriptionsstart (+1) und einen großen Bereich der TrmB-Bindestelle (unterstrichen). Wie erwartet befindet sich die TrmBL1-Bindestelle auch genau im Bereich des TGM-Motivs (Fettdruck). In Abb. 36B sind die Footprint-Daten für TrmBL1 am MD-Promotor noch einmal zusammengefasst.

In vitro Transkriptionsversuche mit der MD-Promotor-Matrize und steigenden Konzentrationen TrmBL1 ($0,05$ – $0,50 \mu\text{M}$) belegten, dass bei Bindung des Regulators die Transkription am MD-Promotor inhibiert wird (Abb. 37A). Bei Zugabe von nur $0,10 \mu\text{M}$ TrmBL1 fiel die Aktivität im Vergleich zur basalen Transkription (Spur 1) bereits auf 56% ab (Spur 3), um bei $0,40 \mu\text{M}$ TrmBL1 auf unter 10% zu sinken (Spur 6). Die Affinität von TrmBL1 am MD-Promotor ist damit deutlich höher als die von TrmB (vgl. Kap. III, 1.5). Wie beim PFK-Promotor wird durch Bindung von TrmBL1 vermutlich auch hier die Rekrutierung der RNAP verhindert und die Transkription somit gehemmt.

Bei EMSA-Versuchen am TM-Promotor verursachte TrmBL1 ebenfalls einen Shift. Allerdings war die Affinität von TrmBL1 hier um etwa das 6fache geringer als beim MD-Promotor (Lee *et al.*, 2007b). Mittels *in vitro* Transkriptionsversuchen mit steigenden Mengen TrmBL1 ($0,50$ – $3,00 \mu\text{M}$) konnte nachgewiesen werden, dass der Regulator die Transkription auch am TM-Promotor reprimierte, wenn auch mit deutlich geringerer Effizienz als am MD-Promotor (Abb. 37B). Im Vergleich zur basalen Transkription (Spur 1) fiel die Aktivität erst bei $1,50 \mu\text{M}$ TrmBL1 deutlich ab (33%; Spur 4) und sank auch bei $3,00 \mu\text{M}$ TrmBL1 nicht unter 10% (Spur 7).

Nachdem nun bekannt war, dass TrmBL1 sowohl am MD- als auch am TM-Promotor als Repressor fungiert, stellte sich wieder die Frage nach möglichen Induktoren, welche die TrmBL1-vermittelte Repression hier aufheben können. In Abb. 38A sind

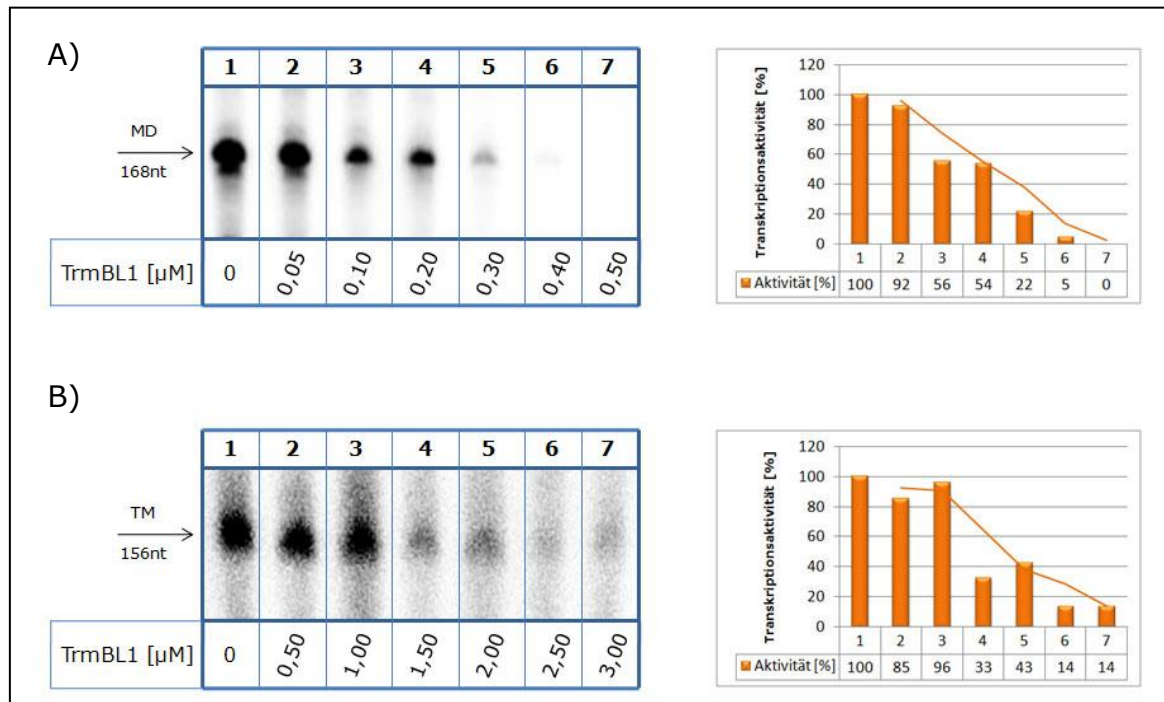


Abb. 37: *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmBL1 an den Zielpromotoren von TrmB.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer II (A) bzw. III (B).

Zu sehen ist der Effekt von steigenden Konzentrationen TrmBL1 (0,05–0,50 μ M bzw. 0,50–3,00 μ M) auf die Transkription am A) MD-Promotor und am B) TM-Promotor (jeweils Spuren 2–7). Spur 1 stellt jeweils die Kontrolle ohne Regulator dar. TrmBL1 inhibiert die Transkription an beiden Promotoren. Pro Ansatz kamen 150 fmol Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Quantifizierungen mit Trendlinien sind in den Diagrammen rechts dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

die entsprechenden Transkriptionsversuche mit 0,3 μ M TrmB und 0,25 bis 5,00 mM a) Maltotriose, b) Glucose und c) Maltose dargestellt (jeweils Spuren 3–7). Obwohl TrmBL1 eine große Affinität für den MD-Promotor besitzt, wirkte das Substrat des MD-Transporters, Maltotriose, für TrmBL1 hier überraschenderweise nicht als Induktor. Im Vergleich zur basalen Transkription (Spur 1) ist auch bei Zugabe von 5,00 mM Maltotriose keine Aktivität zu verzeichnen (0%, Spur 7).

Auch Glucose besaß hier keine Induktor-Wirkung und konnte die TrmBL1-vermittelte Hemmung der Transkription am MD-Promotor nicht aufheben (Spuren 3–7). Bei Zugabe von bis zu 5,00 mM Glucose stieg die Aktivität nicht über 10%.

Maltose ist dagegen eindeutig ein Induktor für TrmBL1 am MD-Promotor. Bereits bei 0,25 mM Maltose stieg die Aktivität wieder auf 36% (Spur 3). Bei 5,00 mM Maltose wurde die TrmBL1-vermittelte Hemmung vollständig aufgehoben und die Aktivität erreicht 98% (Spur 7).

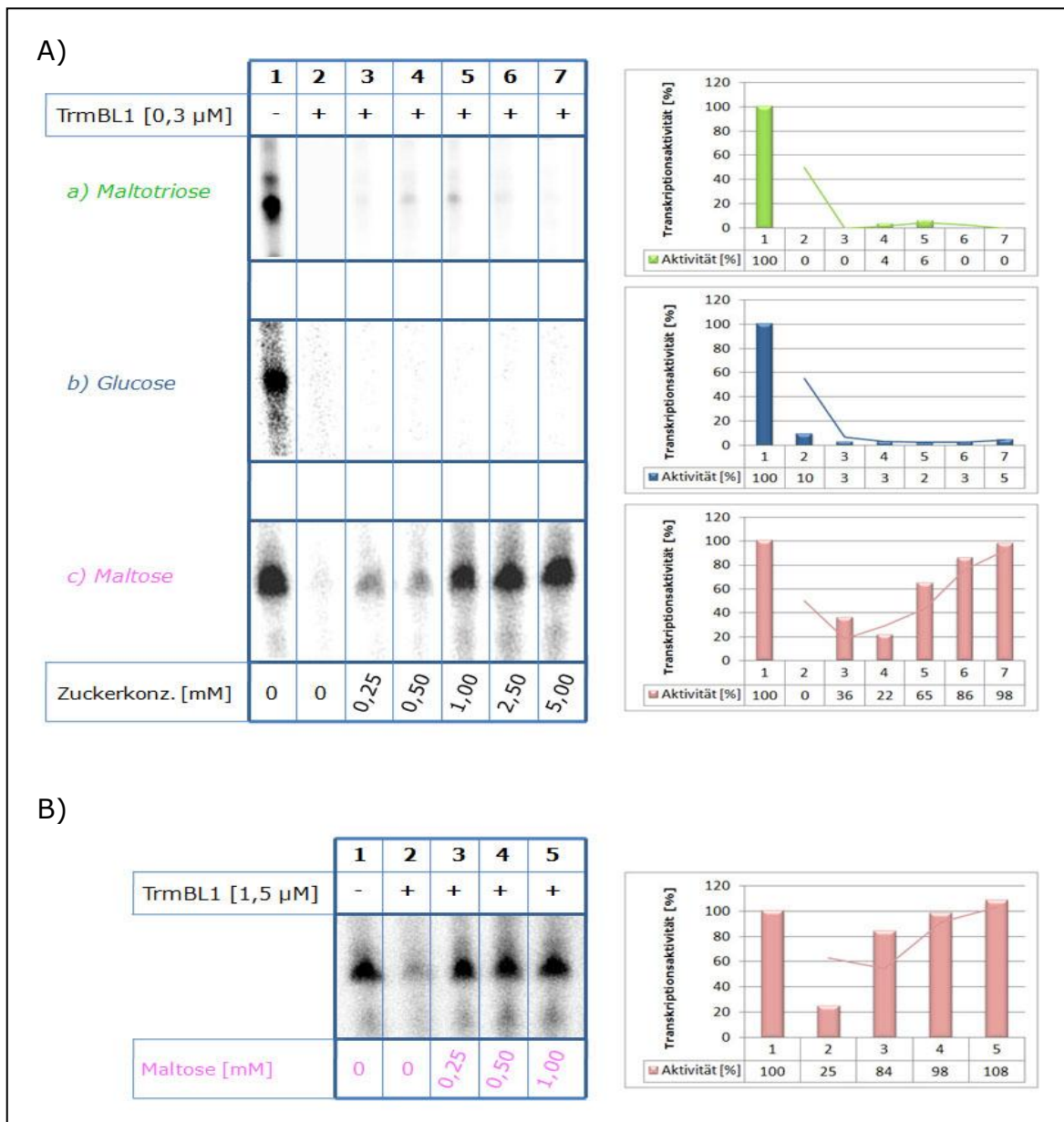


Abb. 38: *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmBL1 an MD- bzw. TM-Promotor in Anwesenheit verschiedener Zucker.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer II (Aa,b.) bzw. III (Ac, B).

Zu sehen ist der Effekt von A) steigenden Konzentrationen (0,25–5,00 mM) Maltotriose (a), Glucose (b) bzw. Maltose (c) auf die Transkription am MD-Promotor, sowie von B) 0,25 bis 1,00 mM Maltose auf die Transkription am TM-Promotor in Anwesenheit von 0,3 bzw. 1,5 μ M TrmBL1 (Spuren 3–7 bzw. 3–5). Die Spuren 1 und 2 repräsentieren jeweils die Kontrollen ohne und mit TrmBL1 in Abwesenheit von Zuckern. Maltose wirkt an beiden Promotoren als Induktor.

Pro Ansatz kamen 150 fmol Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Länge des Transkripts betrug 168 (MD) bzw. 156nt (TM). Die Quantifizierungen mit Trendlinien sind in den Diagrammen rechts dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

Auch am TM-Promotor wirkt Maltose als Induktor im Zusammenhang mit TrmBL1 (Abb. 38B). Bereits 0,25 mM Maltose ließen hier die Aktivität auf 84% ansteigen (Spur 3). Bei 0,50 mM Maltose wurde die durch 1,5 μ M TrmBL1 verursachte Transkriptionshemmung wieder vollständig aufgehoben (Aktivität=98%, Spur 4).

6. TrmBL1 ist ein Aktivator der Gluconeogenese

Auch in der Promotorregion von Genen gluconeogenetischer Enzyme in *P. furiosus* konnte das TGM-Motiv nachgewiesen werden. Während sich dieses aber beim PFK-Promotor bzw. beim MD-Promotor stromabwärts der BRE/TATA-Box befindet, ist es bei Genen von Enzymen der Gluconeogenese stromaufwärts der BRE/TATA-Box lokalisiert (Lee *et al.*, 2008). Dasselbe ist auch bei *T. kodakaraensis* der Fall, wo die Transkription gluconeogenetischer Gene vom Regulator Tgr aktiviert wird (Kanai *et al.*, 2008). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob TrmBL1 wie Tgr eine duale Rolle als Repressor und Aktivator einnimmt, und die Transkription von Genen gluconeogenetischer Enzyme in *P. furiosus* ebenfalls aktivieren kann. Dazu wurden *in vitro* Experimente mit TrmBL1 am Promotor des PF0613-Gens durchgeführt, das für die Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) kodiert. Dabei handelt es sich um ein Enzym der Gluconeogenese, welches die Dephosphorylierung von Fructose-1,6-Bisphosphat in Fructose-6-Phosphat katalysiert (Verhees *et al.*, 2003).

6.1. Die FBPase (PF0613)-Promotor-Matrize

Der Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase)-Promotor mit dem Anfangsbereich des PF0613-Gens wurde über die EcoRI- und HindIII-Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle in den Vektor pUC19 ligiert. Mit Hilfe der Primer PF0613BF und PF0613BR konnte ein PCR-Produkt einer Länge von 432 bp gewonnen werden, das als Matrize für die *in vitro* Transkriptionsversuche verwendet wurde (Abb. 39).

Der FBPase-Promotor besitzt zwei verschiedene TATA-Boxen mit jeweils einem eigenen Transkriptions- und Translationsstart (Gindner, 2009). Es wird vermutet, dass bei der Expression des FBPase-Gens zwei Proteine mit unterschiedlich langen N-Termini gebildet werden. Die FBPase-Promotor-Matrize lieferte demnach auch zwei run-off Transkripte: ein Hauptprodukt einer Länge von 320 nt (ausgehend von +1¹) und ein Nebenprodukt, das 375 nt lang ist (ausgehend von +1²). Beide Transkripte starten jeweils mit einem Guanin, das 22 bzw. 8 bp vor dem jeweiligen Translationsstart lokalisiert ist. Der FBPase-Promotor besitzt eine TrmBL1-

Bindestelle, die sich genau zwischen den beiden TATA-Boxen befindet und ein TGM-Motiv überlappt (vgl. Kap. III, 6.2.).

Für EMSA- und DNaseI Footprinting-Versuche wurde für die PCR-Amplifizierung der Matrize ein [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP markierter PF0613AF Primer verwendet.

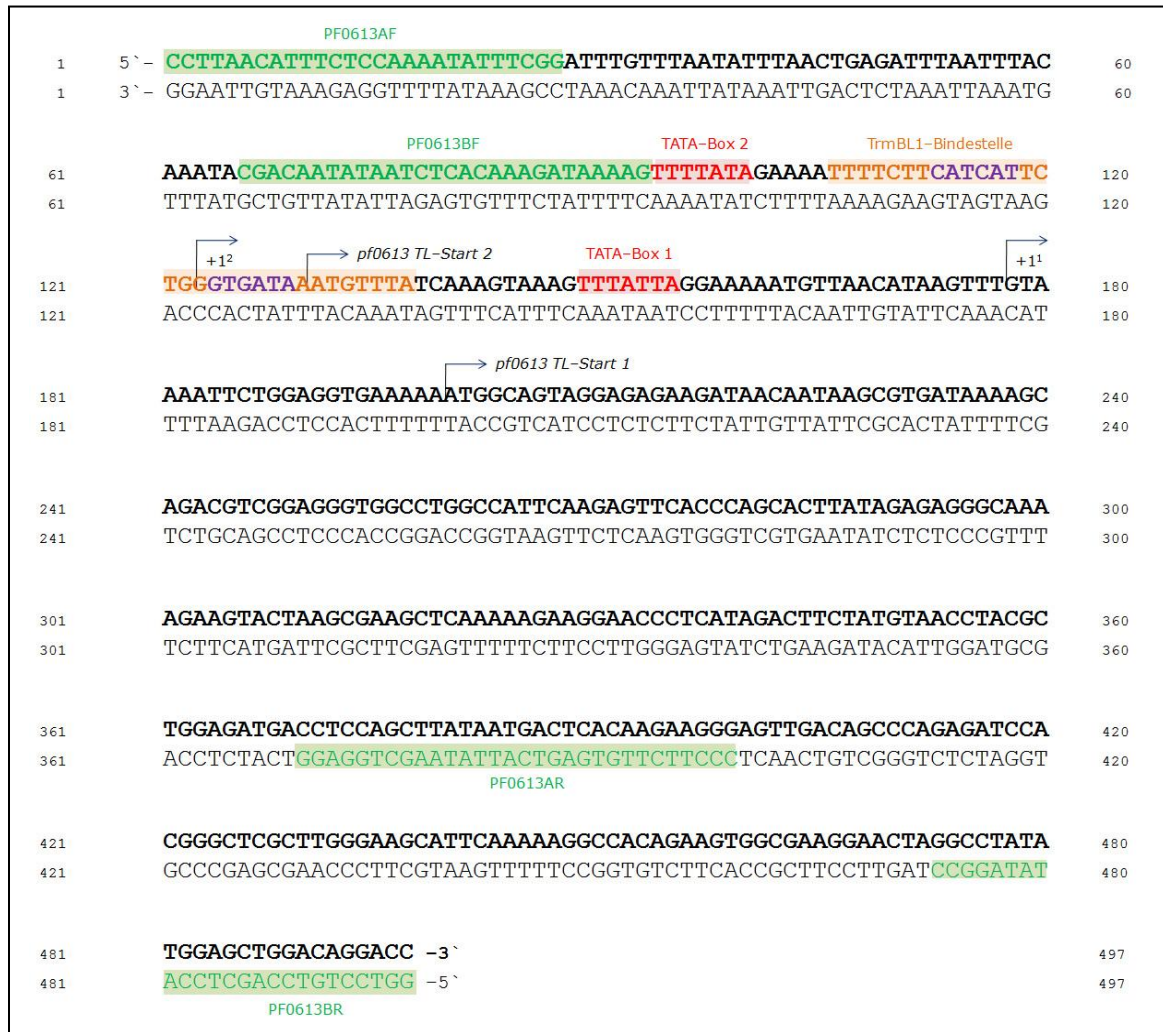


Abb. 39: FBpase (PF0613)-Promotor-Matrize.

Die Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBpase)-Promotorregion mit dem Anfangsbereich des PF0613-Gens wurde über die EcoRI- und BamHI-Schnittstellen in den Vektor pUC19 kloniert und über PCR mit den Primern PF0613BF und PF0613BR (grün dargestellt) amplifiziert. Das so gewonnene PCR-Produkt (Länge: 432 bp) wurde als Matrize in *in vitro* Transkriptionsversuche eingesetzt.

Die beiden TATA-Boxen sind rot dargestellt. Die TrmBL1-Bindestelle ist orange hervorgehoben und befindet sich stromaufwärts der TATA-Box 1 im Bereich des TGM (lila dargestellt). Die beiden Transkriptionsstartpunkte sind mit +1¹ bzw. +1² markiert.

6.2. Bestimmung der TrmBL1-Bindestelle des FBPase-Promotors durch DNaseI Footprinting

Die TrmBL1-Bindestelle des FBPase-Promotors konnte mit Hilfe von DNaseI Footprinting-Experimenten mit einer FBPase-Promotor-Matrize ermittelt werden, deren codierender Strang am 5' Ende mit [γ^{32} P]-ATP markiert war (Abb. 40). Auf dem Autoradiogramm in Abb. 40A ist im Ansatz mit 0,2 μ M TrmBL1 (Spur 2) im Vergleich zum Kontrollansatz ohne TrmBL1 (Spur 1) ein Footprint zu erkennen.

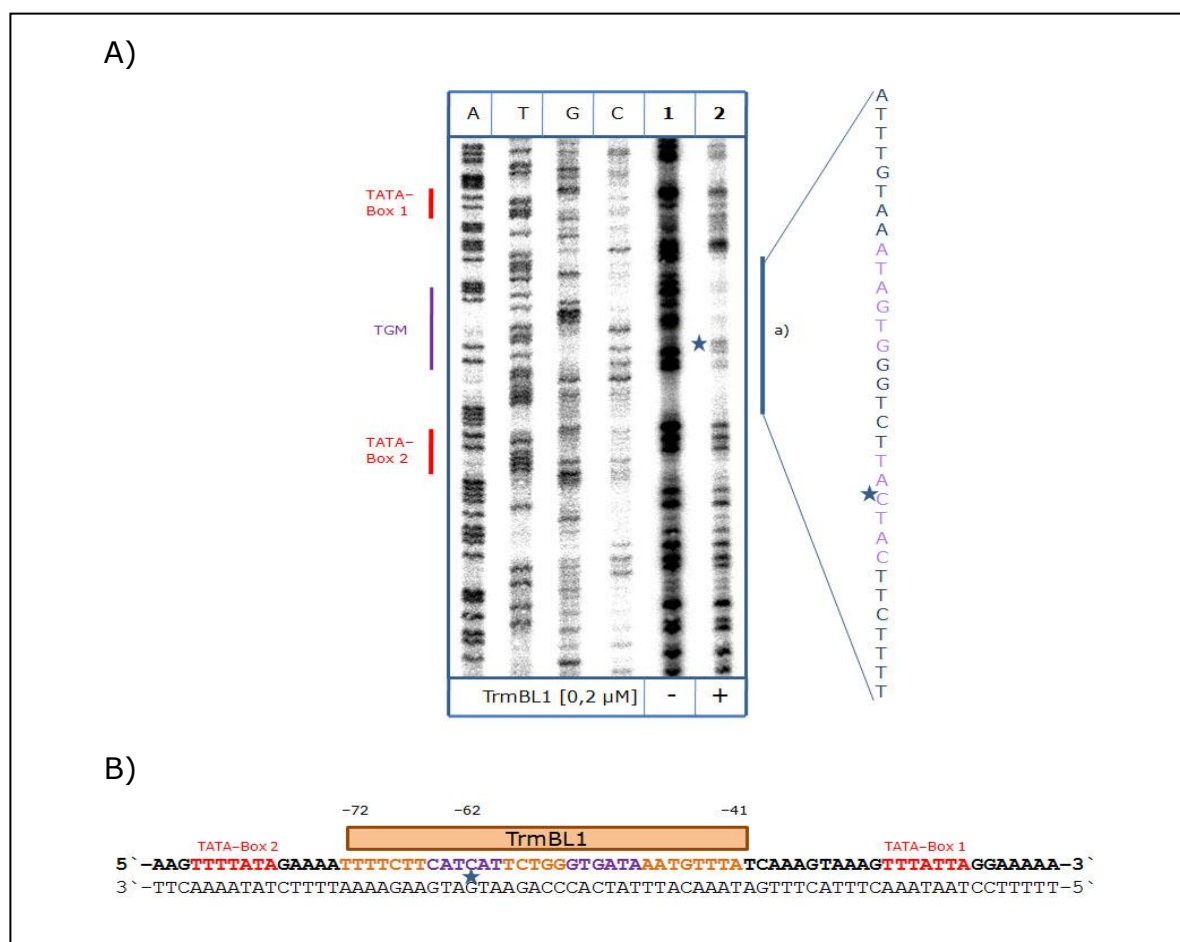


Abb. 40: DNaseI Footprinting-Analyse des FBPase (PF0613)-Promotors mit TrmBL1

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel; DNaseI Footprinting-Puffer II.

A) Ein DNaseI-Verdau wurde am codierenden Strang des FBPase-Promotors in Ab- (1) und Anwesenheit (2) von 0,2 μ M TrmBL1 durchgeführt. a) stellt den Bereich dar, der durch Bindung von TrmBL1 vor dem DNaseI-Verdau geschützt wurde. Die mit A, T, G und C markierten Spuren repräsentieren die Sequenzreaktionen. Der Stern markiert eine hypersensitive Stelle an Position -62. Die Positionen der beiden TATA-Boxen sind rot, die Position des TGM ist lila hervorgehoben. Es kamen pro Ansatz 100 ng FBPase-Promotor-Matrize und 0,0025 U (Spur 1) bzw. 0,01 U (Spur 2) DNaseI zum Einsatz.

B) Zusammenfassung der Footprint-Daten. Die Bindestelle von TrmBL1 ist mit einem orangefarbenen Kasten gekennzeichnet. TrmBL1 bindet zwischen Position -72 und -41. Das TGM-Motiv ist lila hervorgehoben. Die beiden TATA-Boxen sind rot markiert.

Der Abgleich mit dem Sequenzstandard belegt, dass die DNA von TrmBL1 zwischen Position -72 und -41 in Relation zum Transkriptionsstart +1¹ stromaufwärts der TATA-Box 1 vor dem Abbau durch DNaseI geschützt wurde. Die TrmBL1-Bindestelle besitzt demnach die Nukleotidsequenz „5`-TTTTCTT**CATCATT**CTGG**GTGATA**AATGTTTA- 3`“ und befindet sich genau im Bereich zwischen TATA-Box 2 und 1 über dem TGM-Motiv (Fettdruck) und dem Transkriptionsstart +1² (vgl. Abb. 39). An Position -62 innerhalb des TGM-Motivs konnte außerdem eine hypersensitive Stelle nachgewiesen werden. In Abb. 40B sind die Footprint-Daten für TrmBL1 am FBPase-Promotor noch einmal zusammengefasst.

6.3. TrmBL1 aktiviert die Transkription am FBPase-Promotor

Um festzustellen, ob die Bindung von TrmBL1 an den FBPase-Promotor eine Aktivierung der Transkription hervorruft, wurden *in vitro* Transkriptionsversuche mit 0,20–1,00 µM TrmBL1 durchgeführt (Abb. 41A). Da der FBPase-Promotor zwei TATA-Boxen mit entsprechenden Transkriptionsstartpunkten besitzt, erhält man zwei run-off Transkripte: ein Hauptprodukt von 320 nt und ein Nebenprodukt von 375 nt Länge. In der basalen Transkription ohne Regulator erhält man für beide Produkte nur ein sehr schwaches Signal (Spur 1). Werden nun steigende Mengen TrmBL1 zugegeben, ist eine Aktivierung der Transkription des Hauptproduktes festzustellen. Bei 0,60 µM TrmBL1 erreichte die Aktivität ein Maximum und stieg im Vergleich zur basalen Transkription auf das 24fache an (Spur 4). Bei höheren TrmBL1-Konzentrationen fiel die Aktivität wieder leicht ab. Die TrmBL1-vermittelte Aktivierung der Transkription des Hauptproduktes wird auch im Quantifizierungsdiagramm sehr deutlich (blaue Kurve). Im Vergleich zum Hauptprodukt wird das Nebenprodukt deutlich schwächer transkribiert, was vermutlich auf einen schwächeren Promotor zurückzuführen ist. Bei Zugabe von 0,20 µM TrmBL1 wurde auch die Transkription des Nebenprodukts leicht aktiviert. Die Aktivität stieg hier auf 140% (Spur 2). Höhere TrmBL1-Konzentrationen führten dagegen zu einer Hemmung des Nebenprodukts (Aktivität=73%, Spur 4).

Mehrfache Wiederholungen der *in vitro* Transkriptionsversuche am FBPase-Promotor in Anwesenheit von TrmBL1 machten jedoch deutlich, dass die TrmBL1-vermittelte Aktivierung der Transkription des Hauptproduktes nicht konstant reproduzierbar war. Dies wird im Quantifizierungsdiagramm in Abb. 41B deutlich (blaue Kurve). Die basale Transkription (Spur 1) fiel hier insgesamt viel stärker aus als in Abb. 41A. Bei einer sehr geringen TrmBL1-Konzentration von 0,05 µM kam es zu einer

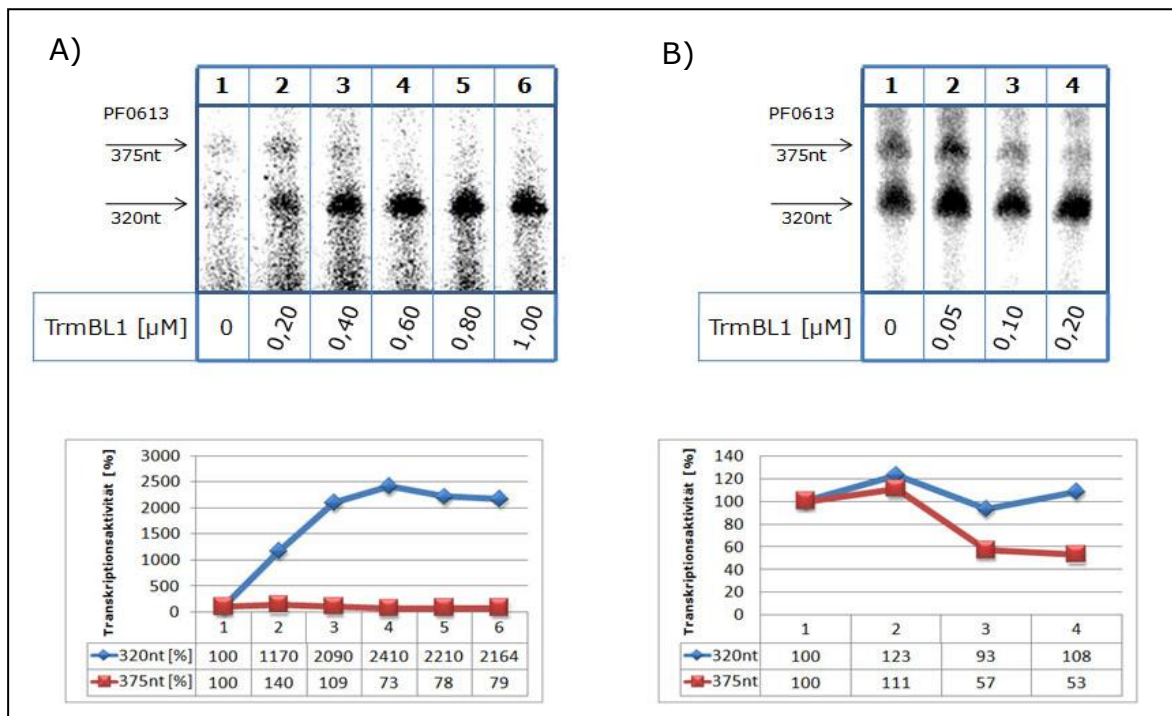


Abb. 41: *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmBL1 am FB Pase-Promotor.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer III.

Zu sehen ist der Effekt von 0,20–1,00 μ M (A) bzw. 0,05–0,20 μ M TrmBL1 (B) auf die Transkription am FB Pase-Promotor. Spur 1 stellt jeweils die Kontrolle ohne TrmBL1 dar. Man erhält zwei Transkripte einer Länge von 375 bzw. 320nt. Die Transkription des Nebenproduktes (375nt) wird von TrmBL1 reprimiert, während die Transkription des Hauptproduktes (320nt) aktiviert wird (A). Die Aktivierung ist jedoch nicht konstant in dem unter A) beobachteten Ausmaß reproduzierbar (B).

Pro Ansatz kamen 150 fmol FB Pase-Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Quantifizierungen sind in den Diagrammen unten dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

schwachen Steigerung der Aktivität um 23%. Bei Zugabe von 0,10 μ M TrmBL1 kam es im Vergleich zur basalen Transkription aber sogar zu einer leichten Repression um 7% (Spur 3), während 0,20 μ M TrmBL1 wieder zu einer schwachen Aktivierung führten (Spur 4).

Die Transkription des Nebenproduktes folgt hier zwar demselben Muster wie in Abb. 41A, allerdings bereits bei geringeren TrmBL1-Konzentrationen. Bei 0,05 μ M TrmBL1 kam es zu einer schwachen Aktivierung auf 111% (Spur 2). Höhere TrmBL1-Konzentrationen führten zu einer deutlichen Hemmung. Die Aktivität sank hier auf 53% bei 0,20 μ M TrmBL1 (Spur 4). Die unterschiedliche Wirkungsweise von TrmBL1 auf die Transkriptionsprodukte ein und desselben Promotors ist dabei vermutlich auf die Position der TrmBL1-Bindestelle zurückzuführen, die in der Region zwischen den beiden TATA-Boxen des FB Pase-Promotors lokalisiert ist (vgl. Abb. 40B).

Da Pyruvat das Endprodukt der Glycolyse bzw. das Ausgangssubstrat der Gluconeogenese ist, bestand die Vermutung, dass Pyruvat womöglich bei der Regulation der Gluconeogenese eine Rolle spielen und die TrmBL1-vermittelte Aktivierung des FBPase-Promotors stabilisieren könnte. Entsprechende Transkriptionsansätze mit 75 nM TrmBL1 und steigenden Mengen Pyruvat konnten dies jedoch nicht eindeutig bestätigen (Abb. 42). Die Zugabe von 75 nM TrmBL1 führte hier wieder zu einer deutlichen Aktivierung der Transkription des Hauptproduktes auf das fast 6fache der basalen Transkriptionsaktivität ohne Regulator (Spur 2). Auch die Transkription des Nebenprodukts wurde leicht aktiviert.

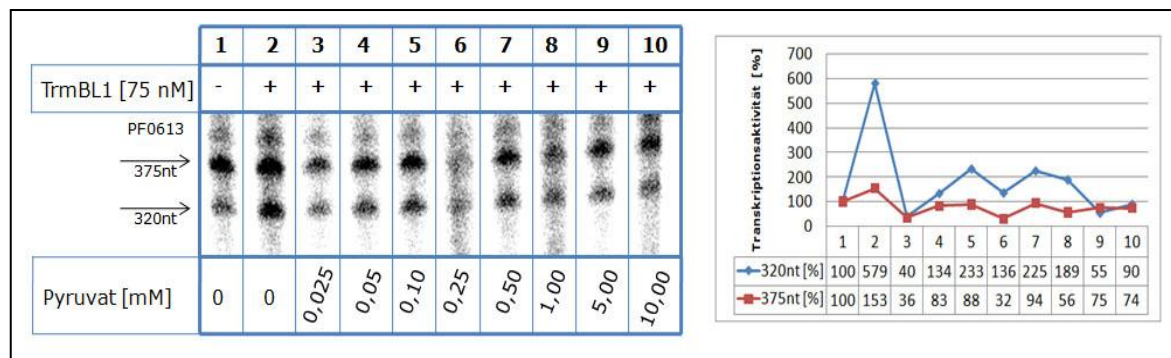


Abb. 42: *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmBL1 am FBPase-Promotor in Anwesenheit von Pyruvat.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer III.

Zu sehen ist der Effekt von 0,025–10,00 mM Pyruvat auf die Transkription am FBPase-Promotor in Anwesenheit von 75 nM TrmBL1 (Spuren 3–10). Die Spuren 1 und 2 repräsentieren die Kontrollen ohne und mit TrmBL1 in Abwesenheit von Pyruvat. Die Zugabe von Pyruvat wirkt sich nicht stabilisierend auf die Aktivierung durch TrmBL1 aus.

Pro Ansatz kamen 150 fmol FBPase-Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Quantifizierung ist im Diagramm rechts dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

Bei der Zugabe von Pyruvat schwankten die Aktivitätswerte jedoch sowohl beim Haupt-, als auch beim Nebenprodukt sehr stark (Spuren 3–10). Und obwohl die Werte in Anwesenheit von Pyruvat über dem Aktivitätswert der basalen Transkription lagen, blieben sie in allen Fällen unter der Transkriptionsrate im Ansatz mit 75 nM TrmBL1 aber ohne Pyruvat (Spur 2). Pyruvat übt somit keine stabilisierende Wirkung auf die TrmBL1-vermittelte Aktivierung der Transkription am FBPase-Promotor aus.

Aktivatoren der Transkription entfalten ihre Wirkung in vielen Fällen, indem sie die Bindung der Transkriptionsfaktoren an den Promotor unterstützen bzw. stabilisieren (vgl. Kap. I, 2.). Bisher kamen in den Transkriptionsansätzen 167 nM TBP und 118 nM TFB zum Einsatz (vgl. Kap. II, 2.5.). Um zu untersuchen, ob auch die TrmBL1-vermittelte Aktivierung am FB Pase-Promotor auf eine Unterstützung der TBP bzw. TFB-Bindung zurückzuführen ist, wurden *in vitro* Transkriptionsversuche mit 50 bzw. 75 nM TrmBL1, sowie suboptimalen TBP- und TFB-Konzentrationen (83 nM TBP bzw. 59 nM TFB) durchgeführt (Abb. 43). In den unter Abb. 43A dargestellten Versuchen wurde nur die TBP-Konzentration, in den Versuchen auf Abb. 43B nur die TFB-Konzentration herabgesetzt. In beiden Fällen wurde die Transkription nicht aktiviert, sondern vielmehr reprimiert. Die Transkriptionsaktivität sank mit 75 TrmBL1 beim Hauptprodukt auf 89 bzw. 48%, beim Nebenprodukt auf 74 bzw. 30% (Spur 3).

Wurde jedoch die Konzentration beider Faktoren gleichzeitig herabgesetzt, kam es zu einer deutlichen Aktivierung der Transkription (Abb. 43C). Die basale Transkription fiel hier aufgrund der suboptimalen TBP und TFB-Konzentration auch deutlich schwächer aus (Spur 1). Beim Hauptprodukt stieg die Aktivität bei Zugabe von 50 nM TrmBL1 um 33% (Spur 2), bei 75 nM um 60% (Spur 3) an. Auffällig ist, dass auch die Transkription des Nebenprodukts hier nicht reprimiert, sondern ebenfalls aktiviert wurde. Die Aktivität erreichte hier 150% bei 75 nM TrmBL1 (Spur 3).

Diese Ergebnisse belegen, dass TrmBL1 in *P. furiosus* ebenso wie Tgr aus *T. kodakaraensis* als Repressor der Glycolyse und Aktivator der Gluconeogenese fungiert. Die TrmBL1-vermittelte Aktivierung der Transkription am FB Pase-Promotor scheint dabei zum Teil auf eine Unterstützung der Bindung von TBP und TFB zurückzuführen sein. Da die Ergebnisse jedoch starken Schwankungen unterworfen und nicht konstant reproduzierbar waren, besteht die Vermutung, dass neben der Stabilisierung von TBP und TFB noch ein weiterer, bisher unbekannter Faktor an der Aktivierung durch TrmBL1 beteiligt sein muss.

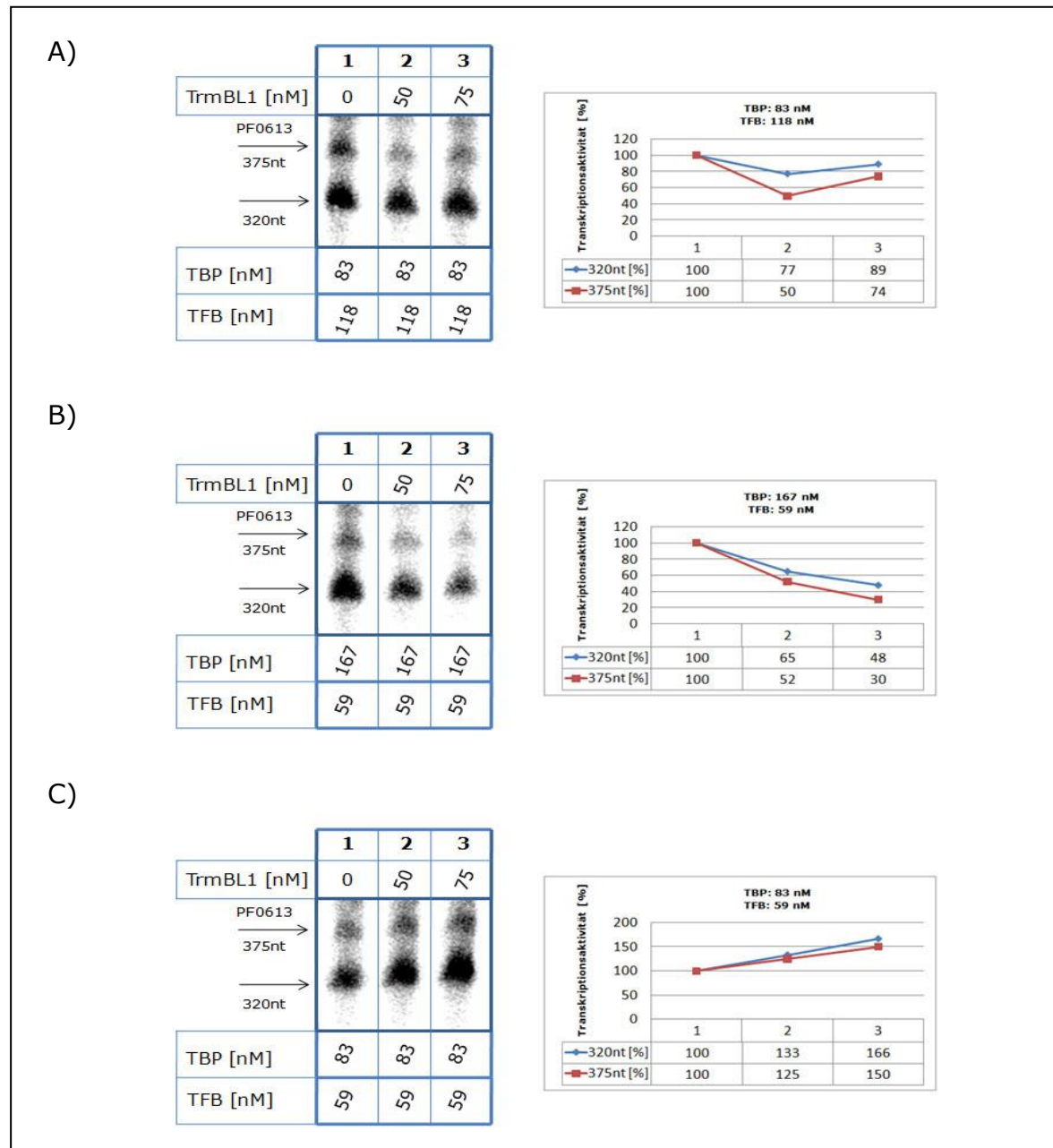


Abb. 43: *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmBL1 am FB Pase-Promotor in Anwesenheit suboptimaler Konzentrationen TBP und TFB.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer III.

Zu sehen ist der Effekt von 50 und 75 nM TrmBL1 in Anwesenheit von A) 83 nM TBP und 118 nM TFB, B) 167 nM TBP und 59 nM TFB bzw. C) 83 nM TBP und 59 nM TFB auf die Transkription am FB Pase-Promotor (jeweils Spuren 2 und 3). Spur 1 stellt jeweils die Kontrolle ohne TrmBL1 dar. Verringert man die Konzentration von nur einem Faktor, wird die Transkription beider Produkte insgesamt reprimiert (A und B). Wird die Konzentration beider Faktoren gleichzeitig herabgesetzt, ist eine Aktivierung festzustellen.

Pro Ansatz kamen 150 fmol FB Pase-Promotor-Matrize zum Einsatz. Die Quantifizierungen sind in den Diagrammen rechts dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \pm 100%).

7. TrmB und TrmBL1 besitzen mehrere DNA-Bindehelices innerhalb ihrer DNA-Bindedomänen

Sowohl TrmB als auch TrmBL1 binden an verschiedene Zielpromotoren und regulieren so die Transkription. Dabei erkennen beide Regulatoren promotorabhängig unterschiedliche Nukleotidsequenzen. Es stellte sich somit die Frage, ob TrmB und TrmBL1 womöglich auch mehrere Bindehelices besitzen und die verschiedenen Bindestelle ihrer Zielpromotoren mit unterschiedlichen Bereichen innerhalb ihrer DNA-Bindedomäne erkennen.

In der N-terminalen DNA-Bindedomäne beider Regulatoren wurden mindestens zwei **Helix-Turn-Helix** (HTH)-Motive vermutet (Abb. 44). Bei TrmB erstreckt sich die HTH 1-Struktur von Aminosäure (AS) 33 bis 54, bei TrmBL1 von 32 bis 53. Die HTH 2-Struktur reicht bei TrmB von AS 83 bis 104, bei TrmBL1 von AS 80 bis 99. Um die DNA-Bindehelices bzw. die zur Bindung an die DNA relevanten Aminosäuren zu identifizieren, wurde sowohl für TrmB als auch für TrmBL1 eine Mutationsanalyse der potentiellen HTH-Motive durchgeführt.

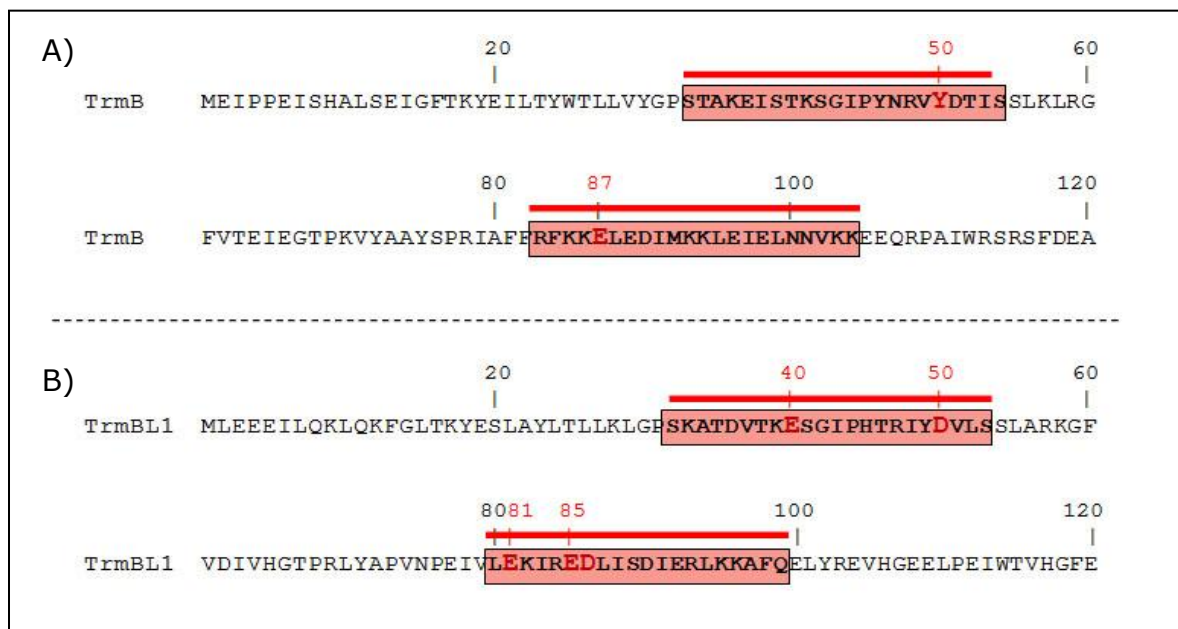


Abb. 44: Aminosäure-Sequenz der N-terminalen DNA-Bindedomäne von TrmB (A) und TrmBL1 (B).

Potentielle HTH-Strukturen sind mit einem roten Kasten gekennzeichnet. Die für die Bindung an die DNA relevanten Aminosäuren an Position 50 und 87 (TrmB) bzw. 40, 50, 81 und 85 (TrmBL1) sind rot hervorgehoben.

7.1. TrmB bindet mit verschiedenen Helices an TM- und MD-Promotor

TrmB erkennt an TM- und MD-Promotor unterschiedliche Bindestellen. Um herauszufinden, welche Bereiche der DNA-Bindedomäne von TrmB für die Bindung an die beiden Zielpromotoren verantwortlich sind, wurden Aminosäure-Punktmutationen innerhalb der potentiellen HTH-Strukturen durch Site Directed Mutagenesis eingeführt. Die entsprechenden Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. Sung-Jae Lee zur Verfügung gestellt. Die TrmB-Mutanten wurden dann im Rahmen dieser Arbeit exprimiert, gereinigt und in *in vitro* Transkriptionsversuchen am TM- und MD-Promotor auf ihre Fähigkeit getestet, die Transkription zu reprimieren. Dabei kamen bei jeder Mutante steigende Konzentrationen von 0,5–3,0 μM zum Einsatz (Abb. 45). In Abb. 45A sind die Ergebnisse für TrmB-Mutanten dargestellt, die eine Punktmutation innerhalb der ersten, potentiellen HTH-Struktur aufwiesen. Bei TrmB E37A wurde das Glutamat an Position 37 durch ein Alanin ausgetauscht. Das Tyrosin an Position 50 wurde bei TrmB Y50N durch ein Asparagin ersetzt. Und bei TrmB T52K wurde das Threonin an Position 52 durch ein Lysin ausgetauscht.

Ein deutlicher Unterschied in der Transkriptionsrepression bei TM- und MD-Promotor ist bei TrmB Y50N zu erkennen. Die Fähigkeit dieser Mutante, an den TM-Promotor zu binden und somit die Transkription zu hemmen, war deutlich reduziert. Während bei wt TrmB bereits bei 0,3 μM eine vollständige Hemmung der Transkription erfolgte (vgl. Abb. 17), war bei TrmB Y50D auch bei 1,0 μM noch keine Hemmung zu erkennen (Spur 3). Erst bei 2,5 μM TrmB Y50N konnte eine deutliche Reduktion der Transkriptionsrate festgestellt werden (Spur 6). Im Gegensatz dazu war die Fähigkeit von TrmB Y50N, an den MD-Promotor zu binden, kaum eingeschränkt. Wt TrmB hemmte die Transkription ab 1,5 μM nahezu vollständig (vgl. Abb. 17), was auch bei TrmB Y50N der Fall war. Die anderen beiden Mutanten, TrmB E37A und T52K, verhielten sich an beiden Promotoren im Großen und Ganzen wie wt TrmB.

In Abb. 45B sind die Ergebnisse für TrmB-Mutanten dargestellt, die eine bzw. zwei Punktmutationen innerhalb der zweiten, potentiellen HTH-Struktur aufwiesen. Bei TrmB E87A wurde das Glutamat an Position 87 durch ein Alanin ersetzt. TrmB E96A/E98A weist zwei Punktmutationen an Position 96 und 98 auf, bei welchen jeweils ein Glutamat durch ein Alanin ausgetauscht wurde. Auch TrmB E105A/E106A besitzt zwei Punktmutationen. In diesem Fall wurde das Glutamat an Position 105 und 106 jeweils durch ein Alanin ersetzt.

Bei TrmB E87A ist hier ein deutlicher Unterschied zwischen TM- und MD-Promotor zu erkennen. Im Gegensatz zu TrmB Y50N hatte TrmB E87A die Bindeaffinität zum MD-

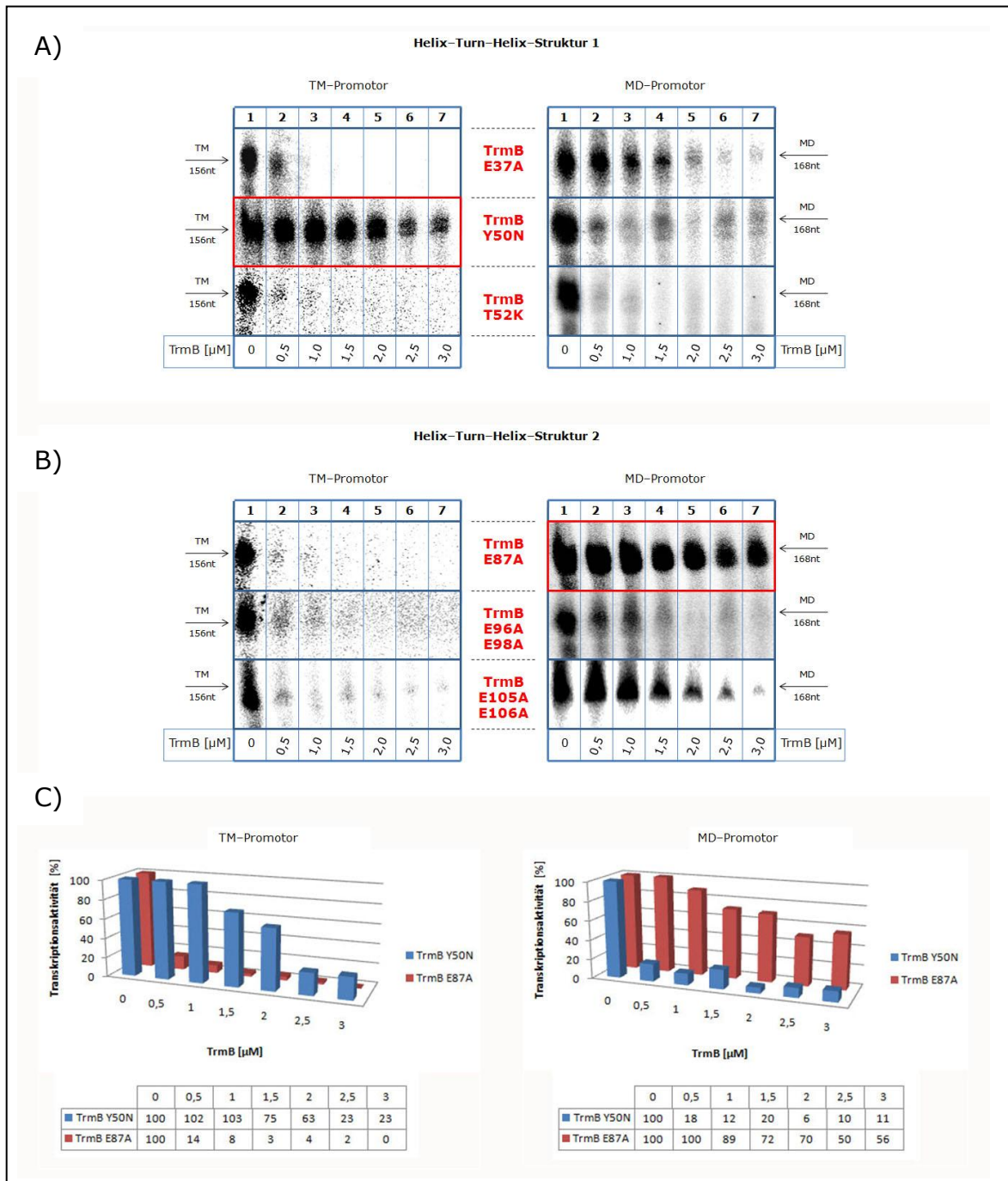


Abb. 45: *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmB-Mutanten am TM- und MD-Promotor im Vergleich.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer III.

Zu sehen ist der Effekt verschiedener TrmB-Mutanten (0,5–3,0 μM) auf die Transkription am TM- bzw. MD-Promotor (Spuren 2–7). Spur 1 stellt jeweils die Kontrolle ohne Regulator dar. Unter A) sind die Ansätze mit TrmB-Mutanten dargestellt, die eine Punktmutation innerhalb der ersten HTH-Struktur besitzen. Unter B) sind Ansätze mit Mutanten abgebildet, die eine bzw. zwei Punktmutationen innerhalb der zweiten HTH-Struktur aufweisen. Die HTH 1-Struktur ist dabei ausschlaggebend für die Bindung an den TM-Promotor (TrmB Y50N; rot umrahmt). Die HTH 2-Struktur ist essentiell für die Bindung an den MD-Promotor (TrmB E87A; rot umrahmt). Pro Ansatz kamen 150 fmol Promotor-Matrize zum Einsatz. Unter C) sind die Quantifizierungsdiagramme für TrmB Y50N (blaue Balken) und TrmB E87A (rote Balken) am TM- und MD-Promotor dargestellt (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%).

Promotor nahezu vollständig verloren, während die Transkription des TM-Promotors mit derselben Effizienz von wt TrmB inhibiert wurde. Bei TrmB E96A/E98A und TrmB E105A/E106A waren in der Transkriptionshemmung an TM- und MD-Promotor keine großen Unterschiede zu wt TrmB festzustellen. Lediglich TrmB E105A/106A wies eine eingeschränkte Bindeaffinität am MD-Promotor auf, jedoch nicht so stark wie TrmB E87A.

Diese Ergebnisse belegten, dass TrmB tatsächlich mit verschiedenen Helices an seine Zielpromotoren bindet. Die HTH 1-Struktur ist für die Erkennung des TM-Promotors verantwortlich, wobei das Tyrosin an Position 50 eine essentielle Rolle zu spielen scheint. Im Gegensatz dazu ist die HTH 2-Struktur, und besonders das Glutamat an Position 87, für die Bindung an den MD-Promotor ausschlaggebend. In Abb. 45C sind die Quantifizierungsdiagramme der Ansätze mit TrmB Y50N (blaue Balken) bzw. TrmB E87A (rote Balken) für TM- und MD-Promotor im Vergleich dargestellt. Hier wird das unterschiedliche Bindeverhalten beider TrmB-Mutanten noch einmal sehr deutlich. Die Bindeaffinität und damit die Fähigkeit zur Transkriptionshemmung von TrmB Y50N war am TM-Promotor deutlich eingeschränkt. Erst bei 2,5 μM fiel die Aktivität im Vergleich zur basalen Transkription auf unter 50%. TrmB E87A verhielt sich am TM-Promotor dagegen wie wt TrmB. Die Transkriptionsaktivität sank hier bereits bei 0,5 μM auf 14%.

Beim MD-Promotor war es genau umgekehrt. Hier hatte TrmB E87A die Bindeaffinität zum Promotor verloren und die Transkriptionsaktivität sank im Vergleich zur basalen Transkription auch bei 3,0 μM nicht unter 50%. TrmB Y50N inhibierte die Transkription des MD-Promotor dagegen mit derselben Effizienz wie wt TrmB.

In weiteren Transkriptionsansätzen wurden die Unterschiede in der Transkriptionshemmung von TrmB Y50N und TrmB E87A am TM- und MD-Promotor noch einmal in Anwesenheit entsprechender Induktoren herausgearbeitet (Abb. 46). Am TM-Promotor wurde die von 0,5 μM wt TrmB verursachte Hemmung von 1,0 mM Maltose wieder aufgehoben (Abb. 46A, Spuren 2 und 3). Dieselbe Menge TrmB Y50N hatte dagegen kaum Einfluss auf die Transkription (Spuren 4 und 5), während sich TrmB E87A wie wt TrmB verhielt und die Transkription hemmte (Spur 6). Auch hier wirkte Maltose induktorisch (Spur 7). Am MD-Promotor war es genau umgekehrt (Abb. 46B). Die durch 1,5 μM wt TrmB verursachte Hemmung der Transkription wurde hier wie erwartet von 1,0 mM Maltotriose wieder aufgehoben (Spuren 2 und 3). Im Gegensatz zum TM-Promotor verhielt sich am MD-Promotor jedoch TrmB Y50N wie wt TrmB und inhibierte die Transkription (Spur 4), während TrmB E87A keine hemmende Wirkung mehr besaß (Spuren 6 und 7). Wie für wt TrmB wirkte Maltotriose auch für TrmB Y50N als Induktor (Spur 5).

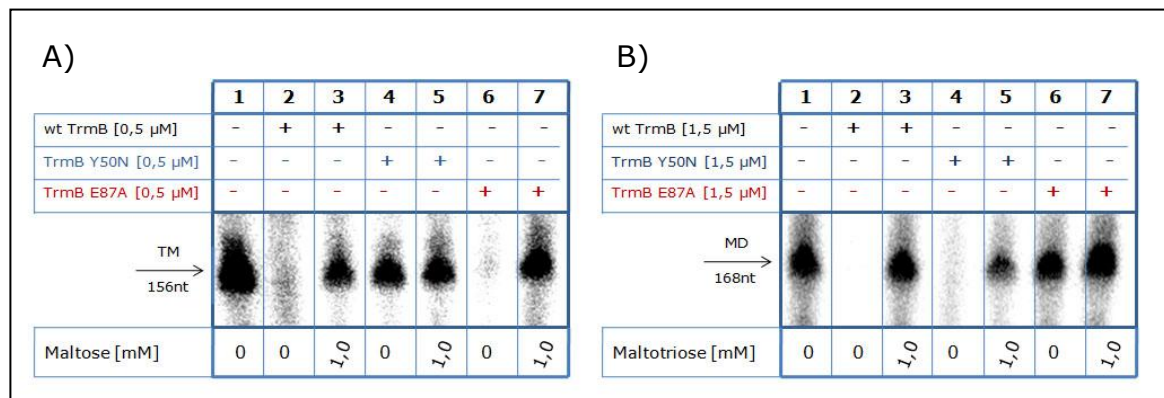


Abb. 46: *In vitro* Transkriptionsversuche mit wt TrmB, TrmB Y50N, TrmB E87A und entsprechenden Induktoren am TM- und MD-Promotor.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer III.

Zu sehen sind die Unterschiede in der Transkriptionshemmung von TrmB Y50N und TrmB E87A am TM- (A) und MD-Promotor (B) in Ab- und Anwesenheit entsprechender Induktoren. Pro Ansatz kamen 150 fmol Promotor-Matrize zum Einsatz.

Um deutlich zu machen, dass die Unfähigkeit zur Transkriptionshemmung von TrmB Y50N bzw. TrmB E87A am TM- bzw. MD-Promotor auf einen Verlust der Bindeaffinität zum entsprechenden Promotor zurückzuführen ist, wurden DNaseI Footprinting- und EMSA-Experimente mit den TrmB-Mutanten und wt TrmB im Vergleich durchgeführt. In Abb. 47 sind DNaseI Footprinting Experimente am codierenden Strang der TM-Promotor-Matrize in Anwesenheit von 1,5 μ M wt TrmB, TrmB Y50N bzw. TrmB E87A zu sehen. Spur 1 repräsentiert die Kontrolle ohne Regulator. Wt TrmB verursachte wie erwartet einen Footprint im Bereich der BRE/TATA-Box (Spur 2; vgl. auch Kap. III, 1.2.). Bei Zugabe von 1,0 mM Maltose verschwand der Footprint, da TrmB sich in Anwesenheit des Induktors vom Promotor löste (Spur 3).

TrmB Y50N war nicht mehr in der Lage, an den TM-Promotor zu binden und konnte die DNA hier nicht vor dem Verdau durch DNaseI schützen; der Footprint blieb aus (Spur 4).

TrmB E87A war dagegen nach wie vor in der Lage an den TM-Promotor zu binden und verursachte wie wt TrmB einen Footprint (Spur 5). Die Zugabe von 1,0 mM Maltose löste auch TrmB E87A wieder vom Promotor und der Footprint blieb aus (Spur 6).

TrmB Y50N hat also die Bindeaffinität zum TM-Promotor verloren, während die Mutation in der zweiten HTH-Struktur von TrmB E87A die Bindung an den TM-Promotor nicht beeinträchtigt.

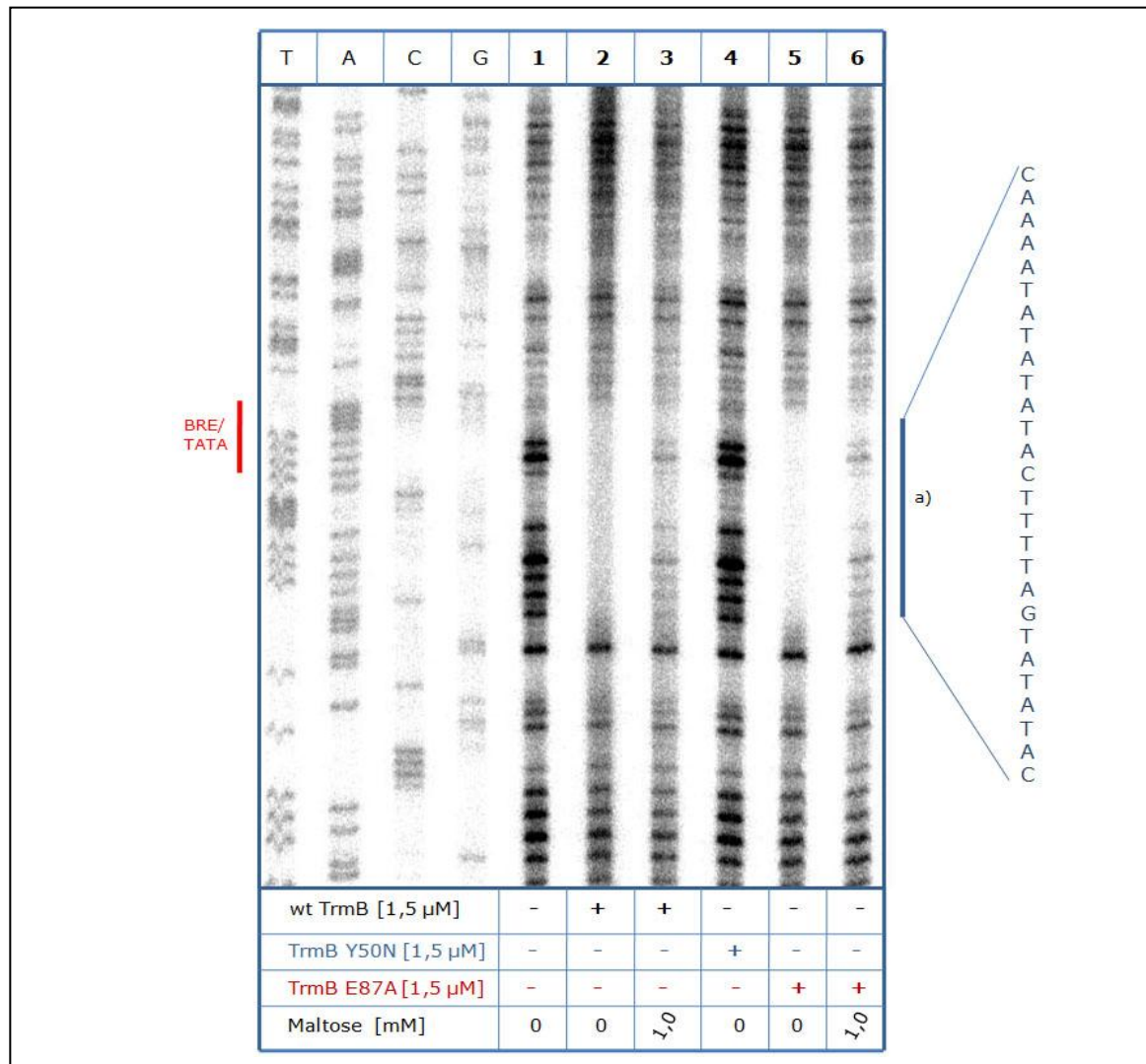


Abb. 47: DNaseI Footprinting-Analyse des TM-Promotors mit wt TrmB, TrmB Y50N bzw. TrmB E87A in Anwesenheit von Maltose

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel; DNaseI Footprinting-Puffer I.

A) Ein DNaseI-Verdau wurde am codierenden Strang des TM-Promotors in Anwesenheit von 1,5 µM wt TrmB (2 und 3), TrmB Y50N (4) bzw. TrmB E87A (5 und 6) durchgeführt. Ansatz 3 und 6 enthielt zusätzlich je 1,0 mM Maltose. Spur 1 stellt den Kontrollansatz ohne Regulator dar. a) repräsentiert den Bereich, der durch Bindung von wt TrmB bzw. TrmB E87A vor dem DNaseI-Verdau geschützt wurde. Die mit A, T, G und C markierten Spuren stellen die Sequenzreaktionen dar. Pro Ansatz kamen 100 ng TM-Promotor-Matrize und 0,01 U (Spuren 1 und 4) bzw. 0,02 U (Spuren 2, 3, 5 und 6) DNaseI zum Einsatz.

Der Versuch, entsprechende DNaseI Footprinting-Experimente am MD-Promotor durchzuführen, schlug leider fehl. Dies liegt vermutlich an der ohnehin deutlich schwächeren Bindeaffinität von TrmB an diesem Promotor. Um auch hier einen Nachweis der unterschiedlichen Bindeaffinität von TrmB Y50N und TrmB E87A zu erhalten, wurden deshalb entsprechende EMSA-Experimente durchgeführt (Abb. 48).

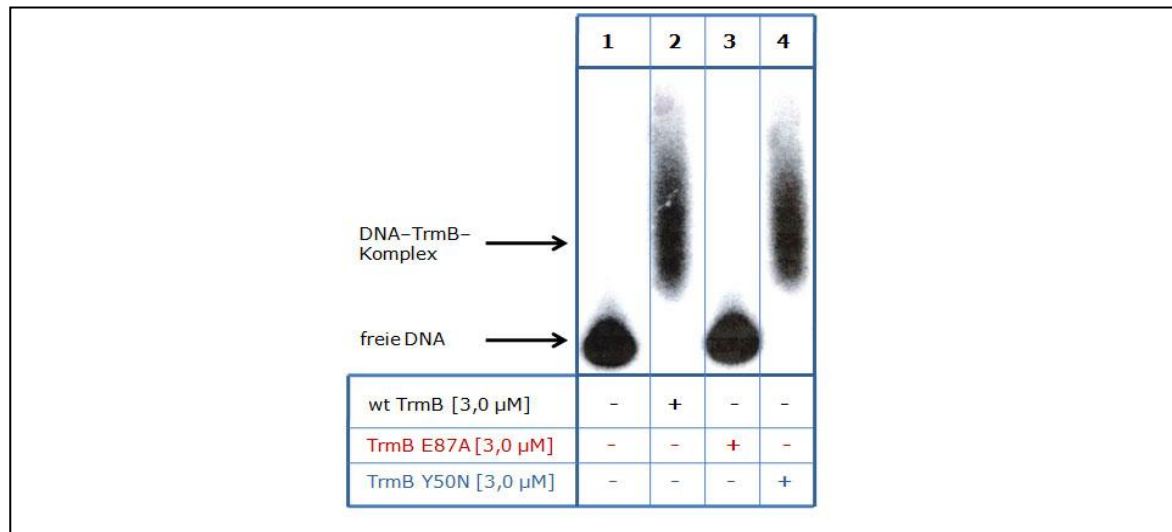


Abb. 48: EMSA-Experimente mit wt TrmB, TrmB Y50N bzw. TrmB E87A am MD-Promotor

Darstellung auf einem 6%igen, nicht denaturierenden PA-Gel.

Die Abbildung zeigt EMSA-Ansätze mit 3,0 µM wt TrmB (2), TrmB E87A (3) bzw. TrmB Y50N (4). Spur 1 zeigt die Kontrolle ohne Regulator. Im Gegensatz zu wt TrmB und TrmB Y50N kann TrmB E87A hier keinen Shift erzeugen. Pro Ansatz kamen 25 ng MD-Promotor-Matrize zum Einsatz.

Obwohl auch hier kein sauberer Shift gelungen ist, wird das unterschiedliche Bindeverhalten der TrmB-Mutanten dennoch deutlich. Die Zugabe von 3,0 µM wt TrmB erzeugte im Vergleich zum Kontrollansatz ohne TrmB (Spur 1) wie erwartet einen Shift (Spur 2). TrmB E87A war nicht in der Lage an den MD-Promotor zu binden und der Shift blieb aus (Spur 3). TrmB Y50N konnte dagegen wie wt TrmB an den MD-Promotor binden und verursachte einen Shift (Spur 4).

Im Gegensatz zum TM-Promotor kann TrmB Y50N also nach wie vor an den MD-Promotor binden, während TrmB E87A die Bindeaffinität zu diesem Promotor verloren hat.

7.2. *In vitro* Versuche mit TrmB Y50N und TrmB E87A am Doppel-promotor TMMD

Um die unterschiedliche Bindeaffinität von TrmB Y50N und TrmB E87A an TM- und MD-Promotor direkt vergleichen zu können, wurden *in vitro* Versuche an einer Promotor-Matrize durchgeführt, die beide Promotoren enthielt.

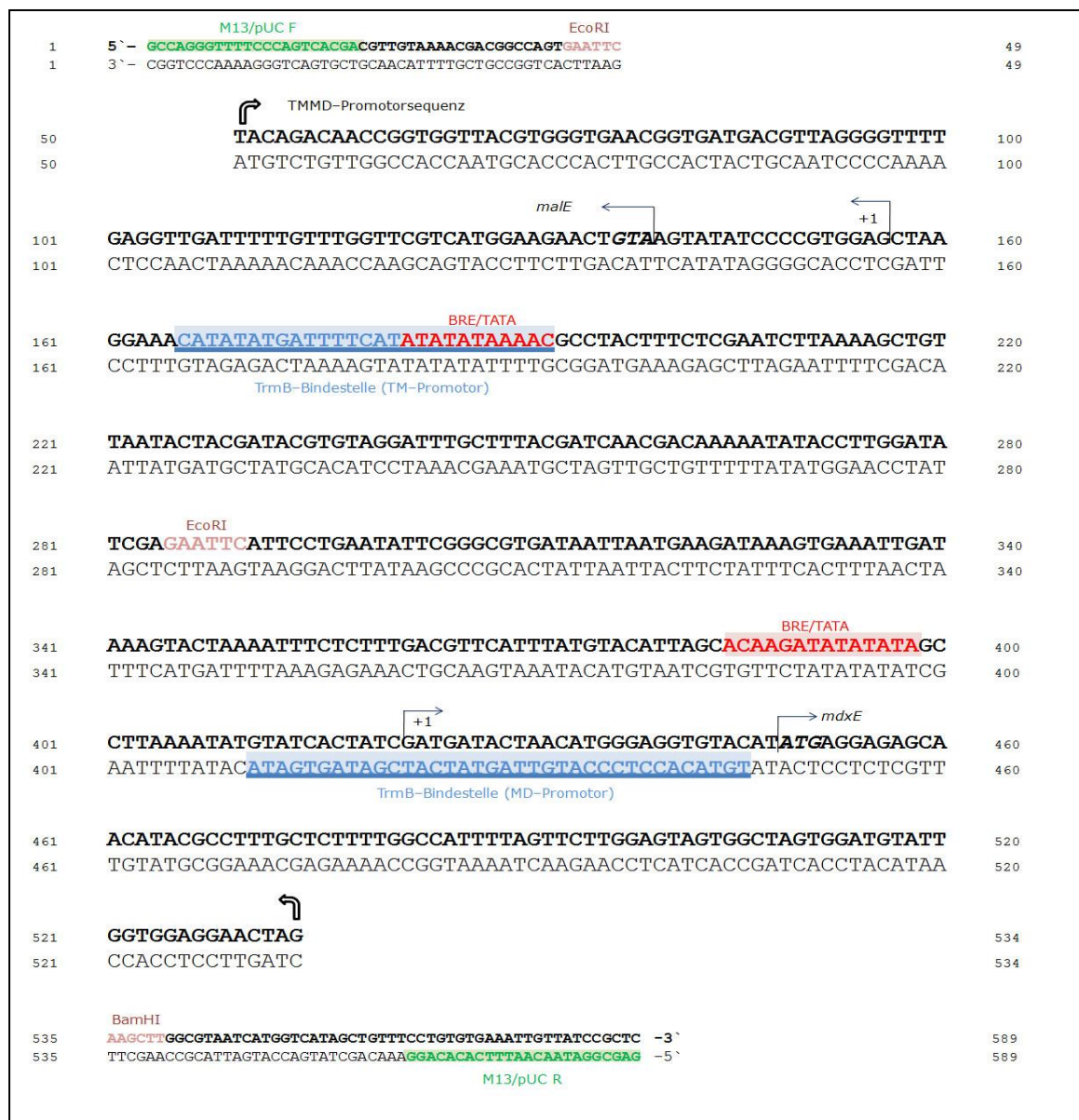


Abb. 49: TMMD-Promotor-Matrize.

Die TM- und MD-Promotorregionen wurden über eine EcoRI-Schnittstelle zum Doppelpromotor TMMD verbunden und über die EcoRI- und BamHI-Schnittstellen (rosa dargestellt) in den Vektor pUC19 kloniert. Mit Hilfe der Primer M13/pUCF und M13/pUCR (grün dargestellt) konnte ein PCR-Produkt gewonnen werden (Länge: 589 bp), das als Matrize für die *in vitro*-Experimente diente.

Die BRE/TATA-Boxen sind rot dargestellt. Die beiden TrmB-Bindestellen sind blau hervorgehoben.

Dazu wurden die TM- und MD-Promotorregionen (vgl. Abb. 13 und 15) über eine EcoRI-Schnittstelle zum Doppelpromotor TMMD zusammengeführt und über die EcoRI und BamHI-Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle in den Vektor pUC19 ligiert (Abb. 49). Mit Hilfe der Primer M13/pUCF und M13/pUCR konnte ein PCR-Produkt einer Länge von 589 bp gewonnen werden, das als Matrize für die *in vitro*-Experimente diente. Da sich mit der TMMD-Promotor-Matrize die TrmB-Bindestellen von TM- und MD-Promotor auf einem Template befanden, war so ein direkter Vergleich der Bindeaffinitäten der TrmB-Mutanten möglich.

DNaseI Footprinting-Experimente mit TrmB am Doppelpromotor erwiesen sich als schwierig. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass die Bindeaffinität von TrmB zur MD-Bindestelle im Vergleich zur TM-Bindestelle deutlich geringer ist. Zum anderen konnte 2005 von Surma gezeigt werden, dass TrmB bevorzugt an die TM-Bindestelle bindet, wenn beide Promotoren gleichzeitig vorhanden sind. Beim DNaseI Footprinting mit TrmB am TMMD-Promotor konnte deshalb nur für die TM-Bindestelle ein Footprint erzeugt werden, während die MD-Bindestelle ungeschützt blieb (nicht gezeigte Daten). Ein direkter Vergleich der Bindeaffinität der TrmB-Mutanten am Doppelpromotor mittels DNaseI Footprinting war deshalb nicht möglich. Mit Hilfe von EMSA-Versuchen am TMMD-Promotor konnte die unterschiedliche Bindeaffinität von TrmB Y50N und TrmB E87A jedoch belegt werden (Abb. 50).

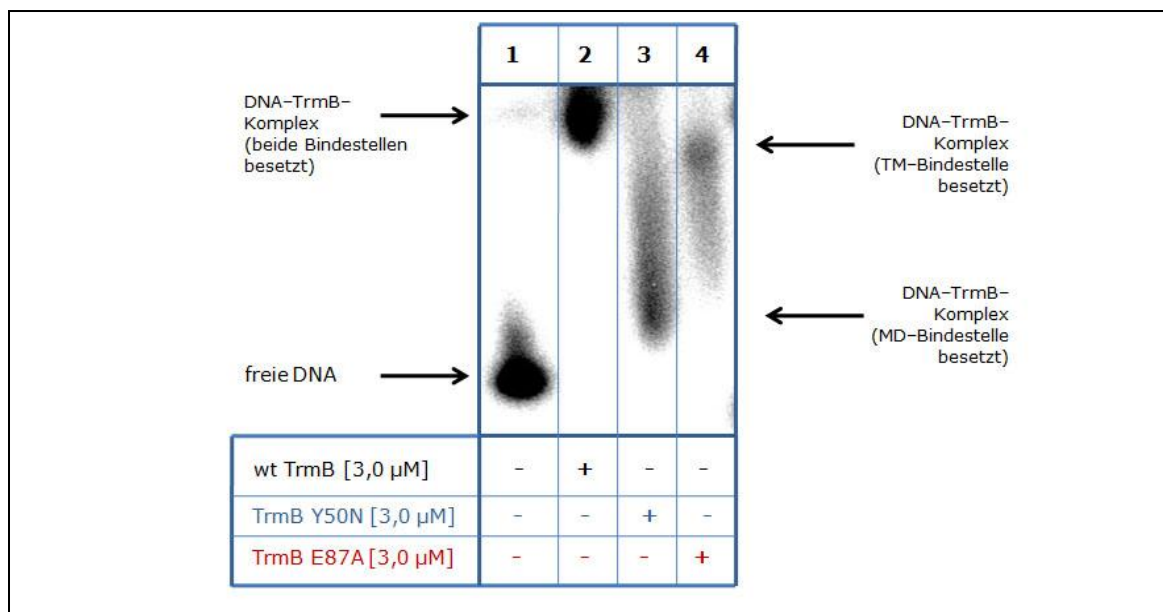


Abb. 50: EMSA-Experimente mit wt TrmB, TrmB Y50N bzw. TrmB E87A am TMMD-Promotor

Darstellung auf einem 6%igen, nicht denaturierenden PA-Gel.

Zu sehen sind EMSA-Ansätze mit 3,0 µM wt TrmB (2), TrmB Y50N (3) bzw. TrmB E87A (4). Spur 1 stellt die Kontrolle ohne Regulator dar. Wt TrmB, TrmB Y50N und TrmB E87A erzeugen jeweils einen Shift unterschiedlicher Höhe. Pro Ansatz kamen 25 ng TMMD-Promotor-Matrize zum Einsatz.

Wt TrmB besetzte beide TrmB-Bindestellen am TMMD-Promotor und erzeugte somit den stärksten und höchsten Shift (Spur 2). TrmB Y50D konnte nicht mehr an die TM-Bindestelle binden und besetzte somit nur die MD-Bindestelle. Der Shift war deutlich schwächer und von niedriger Höhe (Spur 3; vgl. auch Abb. 48). TrmB E87A hatte dagegen die Affinität zur MD-Bindestelle verloren und konnte nur noch an die TM-Bindestelle binden. Auch hier war der Shift im Vergleich zu wt TrmB schwächer und besaß eine etwas geringere Höhe (Spur 4). Die unterschiedliche Höhe der Shifts lässt außerdem vermuten, dass TrmB mit einer unterschiedlichen Quartärstruktur an TM- und MD-Promotor bindet.

Die Schwierigkeit von DNaseI Footprinting- und EMSA-Experimenten mit Regulatoren hyperthermophiler Organismen besteht in der hohen Temperatur. Obwohl die Inkubation der DNA mit den Regulatoren im Bereich der Wachstumstemperatur des Organismus stattfinden konnte (70 bzw. 80°C), mussten DNaseI-Verdau bzw. Gelelektrophorese bei 40°C bzw. Raumtemperatur durchgeführt werden, was die Bindung der Regulatoren an den Promotor negativ beeinflussen kann. Die Ergebnisse der *in vitro* Transkription spiegeln deshalb die *in vivo* Situation wohl am verlässlichsten wieder, da die Reaktion hier komplett bei 80°C durchgeführt werden kann und lediglich das Endprodukt (mRNA) bei der Gelelektrophorese analysiert wird. Aus diesem Grund wurden auch *in vitro* Transkriptionsversuche am TMMD-Promotor mit 1,5–4,5 µM wt TrmB, TrmB Y50N und TrmB E87A durchgeführt (Abb. 51). Die TMMD-Promotor-Matrize lieferte dabei zwei run-off Transkripte einer Länge von 156 nt (TM-Promotor) und 168 nt (MD-Promotor), die zur besseren Auftrennung auf einem 10%igen PA-Harnstoff-Gel analysiert wurden.

Spur 1 repräsentiert den Kontrollansatz ohne Regulator. Auffällig ist hier, dass der TM-Promotor in Abwesenheit von Regulatorproteinen bevorzugt transkribiert wird (vgl. Surma, 2005). Das Signal war um ca. 50 % stärker als das Signal des MD-Promotors. Wurden steigende Mengen wt TrmB zugeben (Spuren 2–4), wurde bei 1,5 µM wt TrmB zunächst nur die TM-Bindestelle besetzt, da sie eine höhere Affinität zu TrmB besitzt. Die Aktivität fiel hier auf 10% (Spur 2). Durch die Blockierung des TM-Promotors wurden nun Transkriptionsfaktoren und RNAP frei und die Transkription des MD-Promotors wurde somit im Vergleich zur basalen Transkription zunächst verstärkt (Aktivität=140%). Bei einer Erhöhung der wt TrmB-Konzentration, wurde auch der MD-Promotor gehemmt, sobald die vorhandenen TM-Bindestellen mit Regulator gesättigt waren. Bei Zugabe von 4,5 µM wt TrmB fiel die Transkription am MD-Promotor auf 52% (Spur 4).

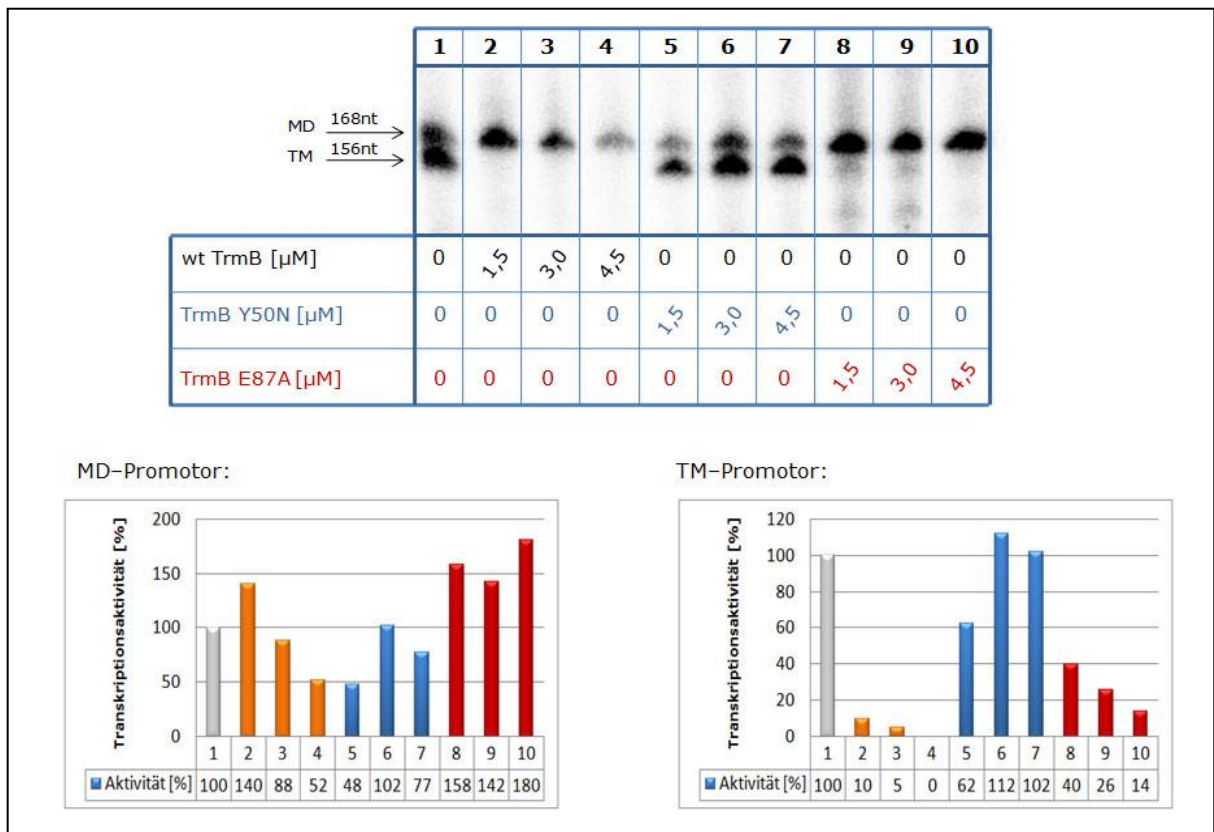


Abb. 51: *In vitro* Transkriptionsversuche mit wt TrmB, TrmB Y50N und TrmB E87A am TMMD-Promotor.

Darstellung auf einem 10%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer III.

Zu sehen ist der Effekt von 1,5–4,5 μ M TrmB (Spuren 2–4), TrmB Y50N (Spuren 5–7) und TrmB E87A (Spuren 8–10) auf die Transkription am TMMD-Promotor. Spur 1 stellt den Kontrollansatz ohne Regulator dar. Pro Ansatz kamen 150 fmol TMMD-Promotor-Matrize zum Einsatz.

Die Quantifizierungen sind in den Diagrammen unten dargestellt. Der graue Balken repräsentiert den Kontrollansatz ohne TrmB (\triangleq 100%). Orangefarbene Balken repräsentieren Ansätze mit wt TrmB, blaue Balken mit TrmB Y50N und rote Balken mit TrmB E87A. Die unterschiedliche Bindeaffinität beider TrmB-Mutanten an TM- und MD-Bindestelle ist deutlich zu erkennen.

Der Unterschied in der Transkriptionshemmung am TMMD-Promotor durch wt TrmB, TrmB Y50N und TrmB E87A wird beim Vergleich der Ansätze mit 4,5 μ M Regulator deutlich (Spuren 4, 7 und 10). Wt TrmB konnte an beiden Bindestellen binden und hemmte beide Promotoren, wobei es eine höhere Affinität zum TM-Promotor besaß (Spur 4). Die Aktivität sank auf 0% (TM) bzw. 52% (MD). TrmB Y50N hatte die Affinität für die TM-Bindestelle verloren und der TM-Promotor lieferte ein starkes Transkriptionssignal (Aktivität=102%), während der MD-Promotor gehemmt bleibt (Spur 7). TrmB E87A konnte dagegen nicht mehr an den MD-Promotor binden,

dessen Transkriptionsaktivität hier 180% beträgt. Der TM-Promotor wird im Gegensatz dazu stark inhibiert (Aktivität=14%; Spur 10).

EMSA- und Transkriptionsversuche mit wt TrmB und den Mutanten TrmB Y50N und TrmB E87A am TMMD-Promotor konnten also bestätigen, dass TrmB mit unterschiedlichen Helices an TM- und MD-Promotor bindet.

7.3. TrmBL1 bindet mit unterschiedlichen Helices an Promotoren mit und ohne TGM

Wie TrmB erkennt auch TrmBL1 verschiedene Nukleotidsequenzen an seinen Zielpromotoren. TrmBL1 bindet dabei zum einen an Promotoren, welche das TGM-Motiv als Zielsequenz innerhalb der TrmBL1-Bindestelle aufweisen. Andererseits erkennt TrmBL1 auch seinen eigenen Promotor, der jedoch kein TGM-Motiv besitzt. Es stellte sich nun die Frage, ob TrmBL1 wie TrmB ebenfalls mehrere DNA-Binderegionen besitzt und Promotoren mit bzw. ohne TGM-Motiv mit verschiedenen Helices erkennt. Es wurden deshalb auch für TrmBL1 verschiedene Mutanten mit Aminosäure-Punktmutationen innerhalb potentieller HTH-Strukturen der DNA-Bindedomäne hergestellt (vgl. Abb. 44B). Diese wurden anschließend in *in vitro* Experimenten auf ihre Bindeaffinität am PFK-Promotor (mit TGM) und am TrmBL1-Promotor (ohne TGM) getestet.

In Abb. 52 sind *in vitro* Transkriptionen am PFK- und TrmBL1-Promotor mit 1,5 und 2,2 μ M der verschiedenen TrmBL1-Mutanten dargestellt. Spur 2 repräsentiert jeweils die Kontrolle mit 1,5 μ M wt TrmB. Die Ergebnisse für TrmBL1-Mutanten, die eine Punktmutation innerhalb der ersten potentiellen HTH-Struktur aufwiesen, sind in Abb. 52A zu sehen. Bei TrmBL1 E40N wurde ein Glutamat an Position 40 durch ein Asparagin ausgetauscht. TrmBL1 D50N besitzt an Position 50 ebenfalls ein Asparagin anstelle eines Aspartats. Bei beiden Mutanten war die Fähigkeit, die Transkription am PFK-Promotor zu hemmen, deutlich reduziert, während die Repression am TrmBL1-Promotor nicht beeinträchtigt wurde.

Bei den TrmBL1-Mutanten mit einer bzw. zwei Punktmutation(en) innerhalb der zweiten potentiellen HTH-Struktur war es genau umgekehrt (Abb. 52B). Hier wurde bei TrmBL1 E81A an Position 81 ein Glutamat durch ein Alanin ersetzt. TrmBL1 besitzt an Position 85/86 anstelle von Glutamat und Aspartat jeweils ein Alanin. Beide Mutanten hatten die Bindeaffinität für den TrmBL1-Promotor verloren und können dort keine Hemmung der Transkription verursachen. Der PFK-Promotor wurde dagegen reprimiert.

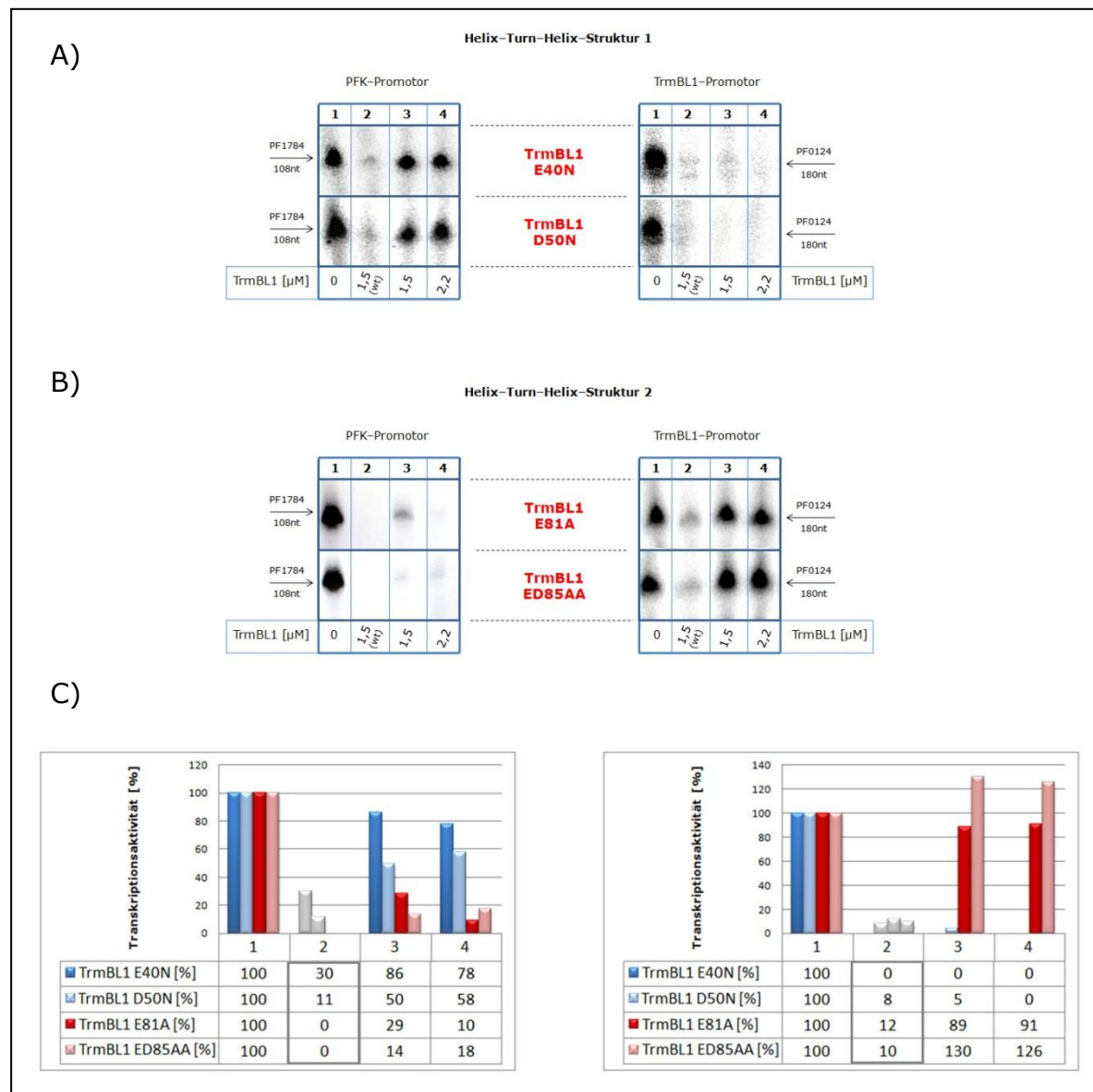


Abb. 52: *In vitro* Transkriptionsversuche mit TrmBL1-Mutanten am PFK- und TrmBL1-Promotor im Vergleich.

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel. Transkriptionspuffer III.

Zu sehen ist der Effekt verschiedener TrmBL1-Mutanten (1,5 und 2,2 μ M) auf die Transkription am PFK- bzw. TrmBL1-Promotor (Spuren 3 und 4). Die Spuren 1 und 2 repräsentieren jeweils die Kontrolle ohne Regulator und mit 1,5 μ M wt TrmBL1. Unter A) sind die Ansätze mit TrmBL1-Mutanten dargestellt, die eine Punktmutation innerhalb der ersten HTH-Struktur besitzen. Unter B) sind Ansätze mit Mutanten abgebildet, die eine bzw. zwei Punktmutationen innerhalb der zweiten HTH-Struktur aufweisen. Die HTH 1-Struktur ist dabei ausschlaggebend für die Bindung an den PFK-Promotor (mit TGM). Die HTH 2-Struktur ist essentiell für die Bindung an den TrmBL1-Promotor (ohne TGM). Pro Ansatz kamen 150 fmol Promotor-Matrize zum Einsatz.

C) stellt die Quantifizierungsdiagramme für alle getesteten TrmBL1-Mutanten am PFK- und TrmBL1-Promotor dar (basale Transkriptionsaktivität ohne Regulator \triangleq 100%). Die Werte für die wt TrmBL1-Kontrolle sind grau umrandet.

In den Quantifizierungsdiagrammen auf Abb. 52C wird die unterschiedliche Bindeaffinität der TrmBL1-Mutanten noch einmal verdeutlicht. Im Vergleich zu wt TrmBL1 (Spur 2, graue Balken) hatten die Mutanten der ersten HTH-Struktur (blaue und hellblaue Balken) die Bindeaffinität zum PFK-Promotor verloren und konnten die Transkription nicht mehr effektiv hemmen. Die Aktivität lag bei über 50% (Spuren 3 und 4). Beim TrmBL1-Promotor inhibierten sie die Transkription dagegen genauso effektiv wie wt TrmBL1 und die Aktivität lag bei um die 0%.

Mutanten der zweiten HTH-Struktur (rote und hellrote Balken) konnten nach wie vor an den PFK-Promotor binden und die Transkription hemmen. Die Aktivität sank hier bei 2,2 μ M TrmBL1 E81A bzw. TrmBL1 ED85AA auf 10 bzw. 18% (Spur 4). Die Bindeaffinität für den TrmBL1-Promotor ging bei diesen Mutanten jedoch verloren und die Aktivität lag auch bei 2,2 μ M bei um die 100% und darüber (Spuren 3 und 4), während wt TrmBL1 die Transkription am TrmBL1-Promotor bereits bei 1,5 μ M vollständig hemmte (Spur 2).

Da die Bindung von Regulatoren in *in vitro* Transkriptionsversuchen jedoch nur indirekt über ihren Einfluss auf die Transkription nachgewiesen werden kann, sollte die Bindung der TrmBL1-Mutanten an den verschiedenen Promotoren auch mit EMSA- und DNaseI Footprinting-Experimenten untersucht werden.

In Abb. 53A sind EMSA-Versuche mit 0,7 μ M wt TrmBL1 bzw. TrmBL1-Mutanten am PFK-Promotor dargestellt. Wt TrmBL1 konnte wie erwartet an die DNA binden und erzeugte einen Shift (Spur 2). Die beiden Mutanten der HTH 1-Struktur, TrmBL1 E40N und TrmBL1 D50N, hatten ihre Fähigkeit, an den PFK-Promotor zu binden, verloren und konnten somit keinen DNA-Shift erzeugen (Spuren 3 und 4). Die beiden Mutanten der HTH 2-Struktur, TrmBL1 E81A und TrmBL1 ED85AA, waren dagegen nach wie vor in der Lage an den PFK-Promotor zu binden und einen Shift zu verursachen (Spuren 5 und 6).

Da der FB Pase-Promotor ebenfalls zu den Zielpromotoren von TrmBL1 gehört und wie der PFK-Promotor ein TGM-Motiv besitzt, sollte mit EMSA-Versuchen getestet werden, ob sich die TrmBL1-Mutanten hier genauso verhalten wie am PFK-Promotor. Auf Abb. 53B ist zu sehen, dass dies der Fall ist. Auch hier hatten die HTH 1-Mutanten ihre Fähigkeit, an den FB Pase-Promotor zu binden, verloren, während die HTH 2-Mutanten nach wie vor einen Shift erzeugten.

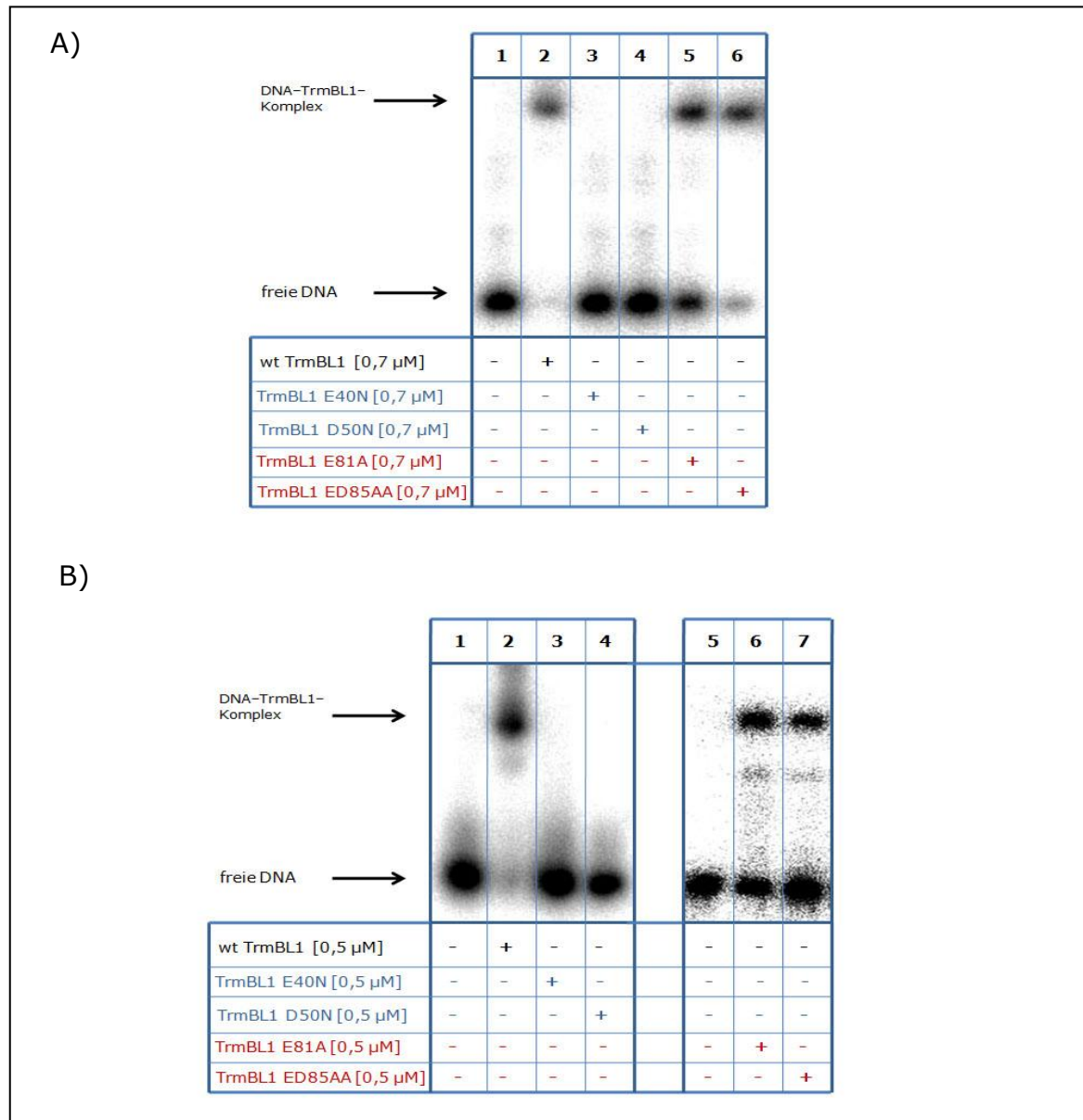


Abb. 53: EMSA-Experimente mit wt TrmBL1 bzw. TrmBL1-Mutanten am PFK- (A) und am FB Pase-Promotor (B)

Darstellung auf einem 6%igen, nicht denaturierenden PA-Gel.

Zu sehen sind EMSA-Ansätze mit 0,7 μ M bzw. 0,5 μ M wt TrmBL1 und TrmBL1-Mutanten am PFK- (A) und am FB Pase-Promotor (B). Spur 1 (A und B) bzw. 5 (B) stellen die Kontrollen ohne Regulator dar.

Wt TrmBL1 erzeugt an beiden Promotoren einen Shift. Mutanten der HTH 1-Struktur (blau dargestellt) haben ihre Bindeaffinität für beide Promotoren verloren, während Mutanten der HTH 2-Struktur (rot dargestellt) nach wie vor an beide Promotoren binden und einen Shift erzeugen können. Pro Ansatz kamen 25 ng TMMD-Promotor-Matrize zum Einsatz.

Die unterschiedliche Bindeaffinität der HTH 1- und HTH 2-Mutanten von TrmBL1 konnte am PFK-Promotor auch durch DNaseI Footprinting nachgewiesen werden. In Abb. 54 sind entsprechende Experimente am codierenden Strang des PFK-Promotors in Anwesenheit von 0,5 μ M wt TrmBL1 und den verschiedenen TrmBL1-Mutanten zu sehen. Spuren 1 und 5 repräsentieren die Kontrollen ohne Regulator. Wt TrmBL1 verursachte wie erwartet einen Footprint im Bereich des TGM (Spuren 2 und 6; vgl. auch Kap. III, 4.2.). Die beiden HTH 1-Mutanten konnten nicht mehr an den PFK-Promotor binden und die DNA vor dem Verdau durch DNaseI schützen; es entstand kein Footprint (Spuren 3 und 4). Bei den HTH 2-Mutanten war die Fähigkeit, an den PFK-Promotor zu binden, nach wie vor vorhanden und es konnte ein Footprint beobachtet werden (Spuren 7 und 8).

Leider ist es nicht gelungen, auch für den TrmBL1-Promotor entsprechende EMSA- und DNaseI-Footprinting-Experimente erfolgreich durchzuführen, da es zu einer Aggregatbildung der Promotor-DNA mit TrmBL1 kam. Der DNA-TrmBL1-Komplex verblieb deshalb in den Geltaschen und konnte nicht analysiert werden. Durch *in vitro* Transkriptionsversuche (vgl. Abb. 52) konnte jedoch nachgewiesen werden, dass am TrmBL1-Promotor nicht die HTH 1-Mutanten, sondern die HTH 2-Mutanten ihre Bindefähigkeit verloren hatten, da sie die Transkription hier nicht mehr hemmen konnten.

Wie bei TrmB scheint somit auch TrmBL1 zwei verschiedene Bindehelices zu besitzen. Dabei werden Promotoren mit TGM-Motiv, wie der PFK- und FBPase- Promotor, über die HTH 1-Struktur gebunden, während Promotoren ohne TGM, wie der TrmBL1-Promotor selbst, über die HTH 2-Struktur erkannt werden.

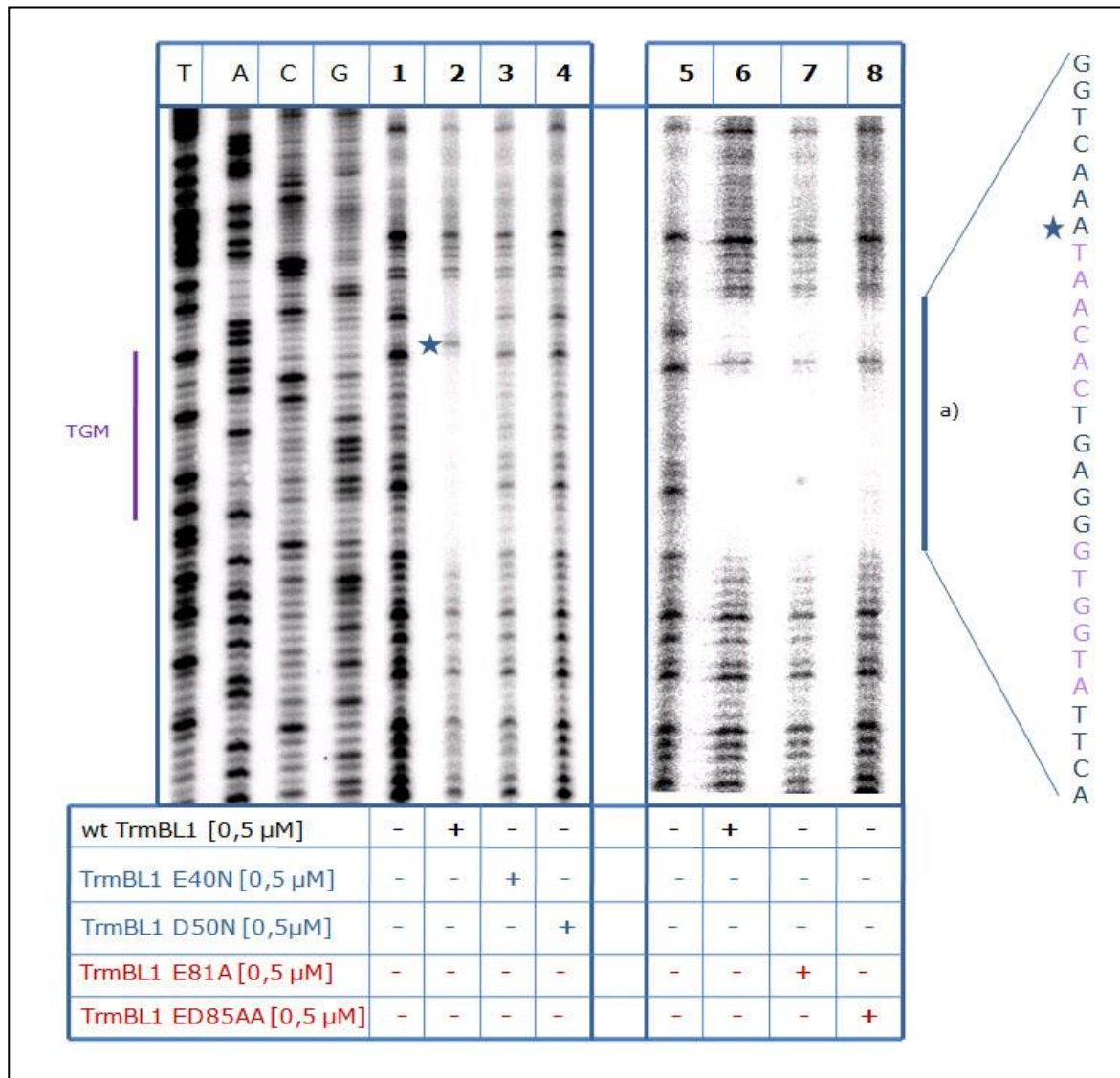


Abb. 54: DNaseI Footprinting-Analyse des PFK-Promotors mit wt TrmBL1 und TrmBL1 – Mutanten im Vergleich

Darstellung auf einem 7%igen PA-Harnstoff-Gel; DNaseI Footprinting-Puffer II.

A) Ein DNaseI-Verdau wurde am codierenden Strang des PFK-Promotors in Anwesenheit von 0,5 µM wt TrmBL1 (2 und 6), TrmBL1-Mutanten der HTH 1-Struktur (3 und 4; blau dargestellt) bzw. TrmBL1-Mutanten der HTH 2-Struktur (7 und 8, rot dargestellt) durchgeführt. Die Spuren 1 und 5 repräsentieren die Kontrollen ohne Regulator. a) stellt den Bereich dar, der durch Bindung von wt TrmBL1 bzw. den HTH 2-Mutanten vor dem DNaseI-Verdau geschützt wurde. Die mit T, A, C und G markierten Spuren stellen die Sequenzreaktionen dar. Pro Ansatz kamen 100 ng PFK-Promotor-Matrize und 0,0025 U (Spuren 1 und 5) bzw. 0,01 U (Spuren 2, 3, 4, 6, 7 und 8) DNaseI zum Einsatz.

IV. Diskussion

Das hyperthermophile Archaeum *Pyrococcus furiosus* ist in der Lage saccharolytisch auf Kohlenhydraten zu wachsen und Zucker wie Maltose, Maltodextrine und Stärke als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (Fiala und Stetter, 1986). Zuckertransport und Zuckerstoffwechsel werden dabei von Regulatoren der TrmB-Familie kontrolliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkungs- und Funktionsweise der Transkriptionsregulatoren TrmB und TrmBL1 näher untersucht.

1. TrmB reguliert das TM- und MD-System

Die Untereinheiten des Maltose/Trehalose (TM)- sowie des Maltodextrin-ABC-Transporters in *P. furiosus* sind auf genetischer Ebene jeweils in einem Gencluster organisiert (Xavier *et al.*, 1996; Horlacher *et al.*, 1998; DiRuggiero *et al.*, 2000; Koning *et al.*, 2002). Durch Bindung des Regulators TrmB im Promotorbereich von TM- und MD-Operon wird in beiden Fällen die Transkription reprimiert (Lee *et al.*, 2003 und 2005). Im Falle des TM-Promotors bindet TrmB direkt im Bereich der BRE/TATA-Box (vgl. Abb. 14) und verhindert so höchstwahrscheinlich die Anlagerung der Transkriptionsfaktoren TBP und TFB und somit die Ausbildung eines Präinitiationskomplexes. Damit hemmt TrmB die Transkription am TM-Promotor nach demselben Mechanismus wie Lrs14 aus *Sulfolobus solfataricus* (Bell und Jackson, 2000; Napoli *et al.* 1999).

Die TrmB-Bindestelle des MD-Promotors befindet sich im Gegensatz dazu stromabwärts der BRE/TATA-Box und überlappt den Transkriptionsstart von *mdxE*. Bei Bindung des Regulators an den MD-Promotor wird so die Rekrutierung der RNAP verhindert und die Transkription inhibiert. Im Gegensatz zum TM-Promotor können hier die Transkriptionsfaktoren gleichzeitig mit TrmB am MD-Promotor gebunden bleiben. Dies hat den Vorteil, dass auf sich ändernde Bedingungen schneller reagiert werden kann, da im Falle einer Transkriptionsinduktion die Faktoren bereits gebunden sind und die Transkription so schneller wieder aufgenommen werden kann. Diese Art der negativen Transkriptionsregulation ist bei Archaeen weit verbreiten. Beispiele weiterer archaeeller Regulatoren, welche die Transkription nach demselben Mechanismus hemmen, sind u.a. LrpA und Phr aus *P. furiosus*, sowie MDR1 aus *Archaeoglobus fulgidus* und Tgr aus *Thermococcus kodakaraensis* (Bell *et al.*, 1999a; Kanai *et al.*, 2007; vgl. Tab. 1).

Mit Hilfe von *in vitro* Transkriptionsversuchen mit TrmB am TM- und MD-Promotor konnte festgestellt werden, dass TrmB die Transkription bei Einsatz äquimolarer

Mengen Promotor-Matrize (jeweils $150 \text{ fmol} \pm 6,2 \text{ nM}$) an beiden Promotoren mit unterschiedlicher Effizienz hemmt. So wird die Transkription am TM-Promotor bereits von $0,3 \text{ }\mu\text{M}$ TrmB vollständig reprimiert (DNA/TrmB-Verhältnis 1:50), während für eine vollständige Transkriptionshemmung am MD-Promotor $1,5 \text{ }\mu\text{M}$ TrmB nötig sind (DNA/TrmB-Verhältnis 1:240). Die Bindeaffinität von TrmB am TM-Promotor ist somit um das 5fache höher als am MD-Promotor.

Da TrmB an TM- und MD-Promotor unterschiedliche Nukleotidsequenzen erkennt und bindet, lag die Vermutung nahe, dass die unterschiedliche Bindeaffinität des Regulators an beiden Promotoren auf die verschiedenen Bindestellen zurückzuführen ist. Eine Mutationsanalyse der TrmB-Bindestelle des TM-Promotors ergab, dass die palindromische Konsensussequenz „5`-**TACTTTT**AGTA-3`“ essentiell für die Promotorerkennung durch TrmB ist (Lee *et al.*, 2005). *In vitro* Transkriptionsversuche mit den Promotormutanten TM2, TM4 und TM6 bestätigten, dass die Fähigkeit von TrmB, die Transkription an den Promotormutanten zu reprimieren, im Vergleich zum wt TM-Promotor stark reduziert ist (vgl. Abb. 18). Eine negative Auswirkung auf die Bindeaffinität und damit auf die Repressor-Wirkung von TrmB hatten dabei vor allem Mutationen, die sich direkt innerhalb der beiden Palindromhälften TACT und AGTA befanden (TM2 und TM4), oder diese indirekt betrafen, indem die polyT-Sequenz dazwischen verlängert wurde (TM6). Auf diese Weise konnte die palindromische Sequenz TACT-N₃-AGTA als Bindemotiv von TrmB identifiziert und daraus ein Bindemodell des Repressors am TM-Promotor abgeleitet werden (Abb. 55A).

Das zweiteilige Bindemotiv lässt vermuten, dass TrmB als Dimer an den wt TM-Promotor bindet, wobei je eine Hälfte des Dimers Kontakt mit einer Palindromhälfte der Konsensussequenz aufnimmt. Wird wie beim TM2 und TM4-Promotor eine Hälfte des Palindroms durch Mutation verändert, kann auch nur noch eine Hälfte des TrmB-Dimers an den Promotor binden. Die Bindeaffinität des Repressors ist deutlich reduziert (Abb. 55A, b und c). Auch wenn die polyT-Sequenz zwischen den beiden Palindromhälften verlängert wird wie beim TM6-Promotor, ist eine Reduktion der Bindeaffinität von TrmB die Folge. Hier wird der Abstand zwischen den beiden inverted repeat-Sequenzen zu lang, so dass auch hier nur eine Hälfte des Dimers binden kann. Dazu kommt eine sterische Behinderung, die entsteht, wenn sich ein weiteres TrmB-Dimer an die zweite Palindromhälfte anlagert (d).

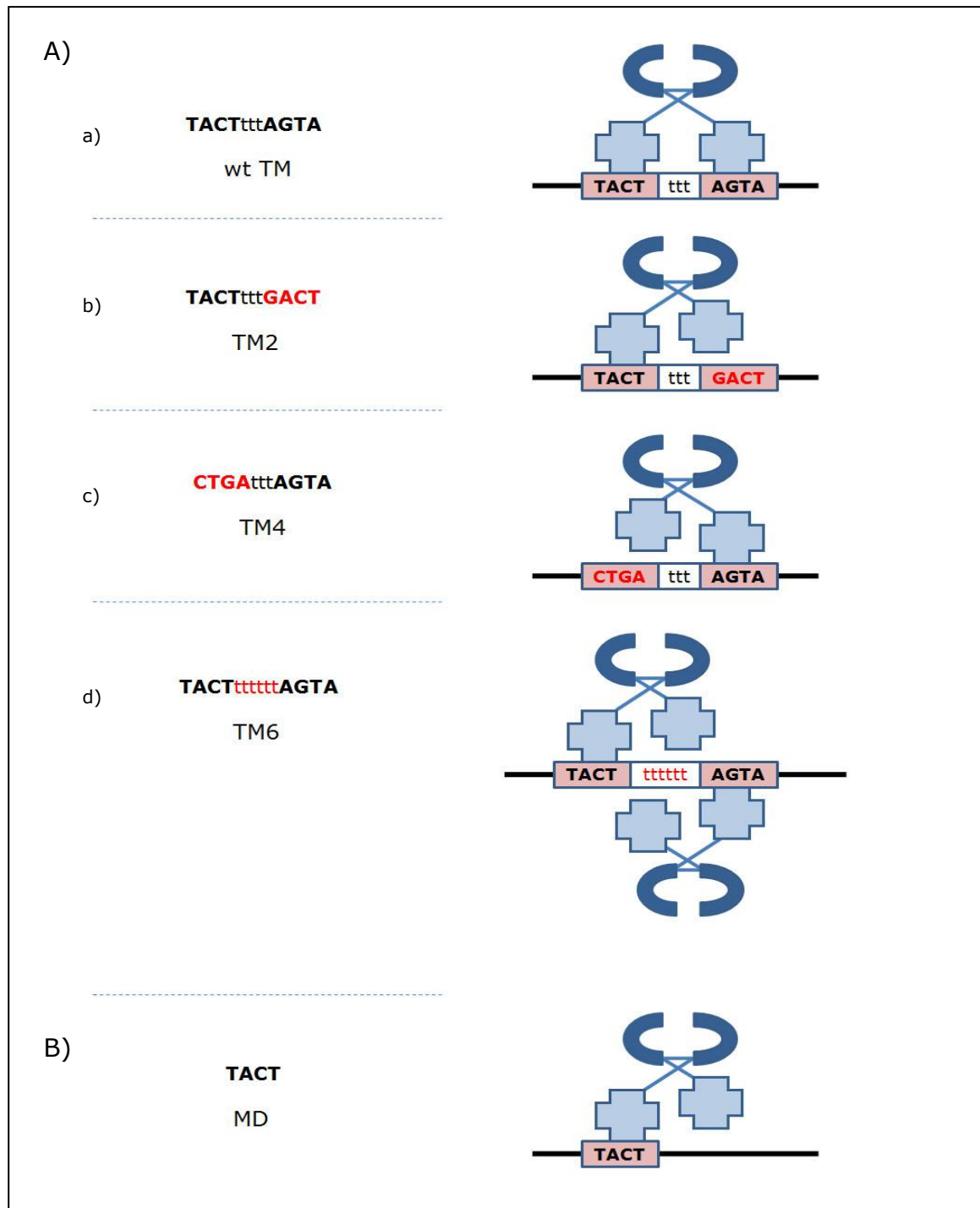


Abb.55: Bindemodell von TrmB am TM- und MD-Promotor.

A) TrmB bindet als Dimer an die palindromische Konsensussequenz TACT-N₃-AGTA des TM-Promotors (a). Wird eine Hälfte des Palindroms durch Mutation verändert wie bei TM2 (b) und TM4 (c), oder wird der N₃-Bereich dazwischen verlängert wie bei TM6 (d), kann nur noch eine Hälfte des Dimers an die DNA binden. Die Bindeaffinität von TrmB wird so stark reduziert. Dasselbe gilt für den MD-Promotor (B), der nur die erste Hälfte des Palindroms besitzt.

Die beiden Palindromhälften sind durch einen rosafarbenen Kasten, die polyT-Sequenz dazwischen durch einen weißen Kasten dargestellt. Mutierte Bereiche sind rot hervorgehoben.

(modifiziert nach Lee *et al.*, 2005).

Da der MD-Promotor nur die erste Hälfte des Palindroms besitzt (TACT), lässt sich so auch erklären, weshalb TrmB am MD-Promotor im Vergleich zum wt TM-Promotor eine 5fach geringere Bindeaffinität besitzt. Auch hier kann nur eine Hälfte des TrmB-Dimers an den Promotor binden (Abb. 55B).

Die TrmB-vermittelte Hemmung der Transkription an TM- und MD-Promotor wird in beiden Fällen durch spezifische Induktoren wieder rückgängig gemacht (vgl. Abb. 17; Lee *et al.*, 2003 und 2005). Für den TM-Promotor sind Trehalose und Maltose Induktoren, während die Effektoren des MD-Promotors, Maltodextrine und Sucrose, nicht in der Lage sind, die TrmB-vermittelte Hemmung am TM-Promotor wieder aufzuheben. So kann die von 0,3 μ M TrmB hervorgerufene Transkriptionshemmung am TM-Promotor durch die Anwesenheit von 0,50 mM Maltose wieder vollständig rückgängig gemacht werden (TrmB/Maltose-Verhältnis 1:1670). Die durch 1,5 μ M TrmB verursachte Repression am MD-Promotor wird dagegen durch 0,25 mM Maltotriose wieder vollständig aufgehoben (TrmB/Maltotriose-Verhältnis 1:170), während Maltose und Trehalose an diesem Promotor in Zusammenhang mit TrmB nicht als Induktoren wirken. Auch Sucrose ist für TrmB am MD-Promotor ein Induktor. Bei Zugabe von 2,50 mM Sucrose werden hier 73% der basalen Transkriptionsaktivität erreicht (TrmB/Sucrose-Verhältnis 1:1670).

Diese Ergebnisse machen eine einzigartige Eigenschaft von TrmB deutlich: Das Repressorprotein erkennt verschiedene Nukleotidsequenzen an unterschiedlichen Promotoren und besitzt eine ausgeprägte, promotorabhängige Zuckerspezifität. Abgesehen von TrmB und TrmBL1 aus *P. furiosus* konnte eine solche Eigenschaft bis dato bei noch keinem weiteren, prokaryotischen Regulator beobachtet werden. Mit Hilfe von *in vitro* Transkriptionsversuchen an einem modifizierten MD-Promotor (MDTA), dessen TrmB-Bindestelle durch die TrmB-Bindestelle des TM-Promotors ausgetauscht wurde, konnte herausgefunden werden, dass die promotorabhängige Induktorspezifität von TrmB durch die unterschiedliche Nukleotidsequenz der TrmB-Bindestelle von TM- und MD-Promotor bestimmt wird. Nach Austausch der Bindestellen hatte der modifizierte MD-Promotor in Bezug auf Bindeaffinität und Induktorspezifität von TrmB die Eigenschaften des TM-Promotors angenommen (vgl. Abb. 19). Diese Ergebnisse legen folgenden Mechanismus der Substratspezifität nahe (Abb. 56): TrmB erkennt verschiedene Nukleotidsequenzen an TM- und MD-Promotor und nimmt bei der Bindung an diese unterschiedliche Konformationen ein. Die durch die Nukleotidsequenz bestimmte Konformation des Repressors überträgt sich auf die Zucker-Bindedomäne und führt dazu, dass TrmB promotorabhängig verschiedene Induktoren erkennt.

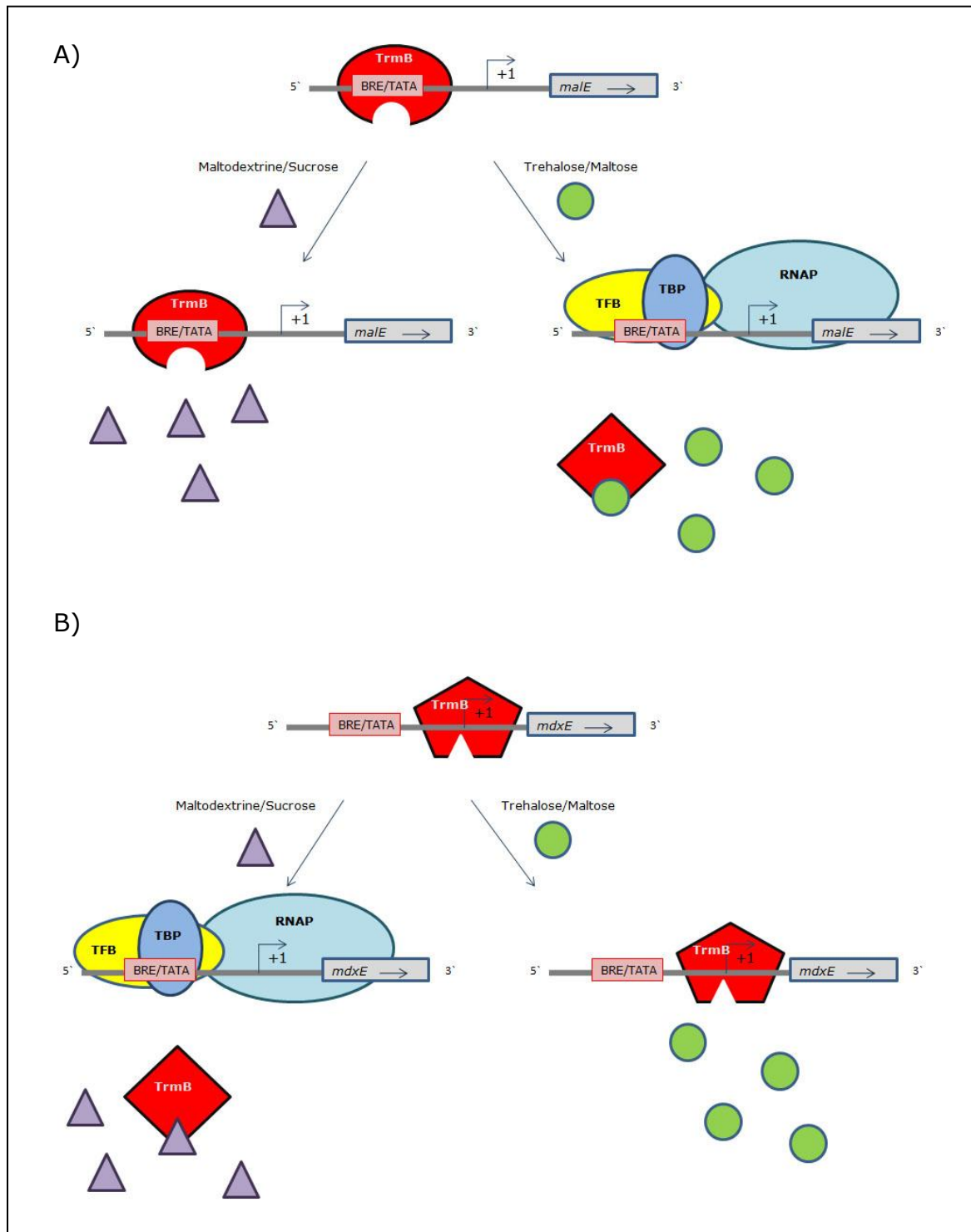


Abb.56: Mechanismus der Substratspezifität von TrmB an TM- und MD-Promotor.

TrmB erkennt unterschiedliche DNA-Sequenzen an TM- und MD-Promotor und nimmt bei der Bindung an diese unterschiedliche Konformationen ein. Als Konsequenz werden vom Regulator promotorabhängig verschiedene Induktoren erkannt, wie Trehalose und Maltose am TM-Promotor (A) bzw. Maltodextrine und Sucrose am MD-Promotor (B).

Bei Bindung an den TM-Promotor nimmt TrmB also eine Konformation ein, die nur die Bindung von Maltose und Trehalose an den Repressor erlaubt. Maltodextrine und Sucrose wirken deshalb nicht als Induktoren (Abb. 56A). Bei Bindung an den MD-Promotor nimmt der Repressor eine andere Konformation ein, welche nun die Bindung von Maltodextrinen und Sucrose ermöglicht, während Maltose und Trehalose nicht mehr als Induktoren erkannt werden (Abb. 56B). Die Nukleotidsequenz der TrmB-Bindestelle bestimmt demnach die Konformation und somit die Zuckerspezifität des Repressors.

Sobald das Substrat an die Zucker-Bindedomäne des Repressors gebunden hat, kommt es zu einer weiteren, substratabhängigen Konformationsänderung von TrmB, die wiederum die Promotorerkennung beeinflusst und die Bindung des Regulators an den Promotor entweder löst oder verstärkt. Die unterschiedliche Interaktion der verschiedenen Substrate mit der Zucker-Bindehelix führt dabei zu unterschiedlichen Bewegungen derselben, die sich auf die DNA-Bindedomäne übertragen und die Promotorerkennung des Repressors beeinflussen (vgl. auch Kap. I, 3.). Ist TrmB an den TM-Promotor gebunden, führt die Bindung von Maltose bzw. Trehalose zu einer Konformation, welche TrmB wieder vom Promotor löst und die Transkription ermöglicht. Dasselbe gilt für Maltodextrine und Sucrose, die als Induktoren wirken, wenn TrmB am MD-Promotor gebunden ist.

Neben den Substraten, die als Induktoren fungieren und TrmB vom jeweiligen Promotor wieder zu lösen vermögen, gibt es auch Zucker, welche bei Bindung an den Repressor dessen Affinität zu einem bestimmten Promotor und somit die TrmB-vermittelte Hemmung verstärken.

Glucose spielt als Abbauprodukt von Maltose und Maltodextrinen sowie als Ausgangssubstrat der Glycolyse bzw. Endprodukt der Gluconeogenese eine zentrale Rolle im Zuckerstoffwechsel und gehört außerdem zu den Substraten von TrmB. Im Zusammenhang mit TrmB ist sie aber weder am TM- noch am MD-Promotor ein Induktor. Mit Hilfe von *in vitro* Transkriptionsversuchen an TM- und MD-Promotor in Anwesenheit von TrmB, dem Induktor Maltose bzw. Maltotriose und steigenden Konzentrationen Glucose konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch ein co-repressiver Effekt von Glucose an beiden Promotoren nachgewiesen werden. So wurde die durch Maltose bzw. Maltotriose induzierte Transkription an TM- und MD-Promotor bei Zugabe von Glucose trotz gleichzeitiger Anwesenheit des Induktors wieder vollständig gehemmt (Maltose bzw. Maltotriose/Glucose-Verhältnis 1:2 bzw. 2:1; vgl. Abb. 20a und 23a). Die Vermutung, Glucose könnte bei hohen Temperaturen mit den Aminogruppen der Transkriptionsfaktoren interagieren und deshalb die

Transkriptionsmaschinerie beeinträchtigen, konnte widerlegt werden (vgl. Abb. 21). Glucose fungiert für TrmB also sowohl für den TM- als auch für den MD-Promotor als Co-Repressor.

Das beim anti-induktorischen Effekt beobachtete Induktor/Glucose-Verhältnis von 1:2 bzw. 2:1 lässt den Schluss zu, dass der co-repressive Effekt von Glucose nicht einfach nur auf ein Konkurrenzverhalten zwischen Glucose und Induktor um die Substratbindestelle des Regulators zurückzuführen ist. Die Bindung von Glucose an TrmB scheint die DNA-bindende Konformation des Regulators vielmehr zu stabilisieren und somit die Repression auch in Anwesenheit des jeweiligen Induktors zu verstärken. Diese Vermutung konnte durch EMSA-Versuche, die 2007 von Lee *et al.* durchgeführt wurden, bestätigt werden. Bei Einsatz von suboptimalen Mengen TrmB wurde hier der durch TrmB-verursachte Shift und damit die Bindeeffizienz von TrmB durch Zugabe steigender Konzentrationen Glucose kontinuierlich verstärkt. Ferner konnte festgestellt werden, dass die Bindeaffinität von TrmB für Glucose von 73 auf 27 μM steigt, wenn der Regulator an den TM-Promotor gebunden ist (Lee *et al.*, 2007a).

Die Anti-Induktor-Wirkung von Glucose macht auch in physiologischer Hinsicht Sinn (Abb. 57). Sind Maltose und Maltodextrine im Medium vorhanden, induzieren diese die Expression der entsprechenden Transportsysteme und gewährleisten so die Substrataufnahme. Im Zellinneren werden Maltose und Maltodextrine über den Dextrin-Stoffwechsel zu Glucose weiterverarbeitet, die dann über einen modifizierten Embden-Meyerhof Weg zu Pyruvat abgebaut wird. Bildet sich ein Überschuss an Glucose in der Zelle, wirkt sie dem induktorischen Effekt von Maltose bzw. Maltodextrinen entgegen und stoppt so trotz Anwesenheit der Induktoren die Expression der entsprechenden Transportsysteme. Auf diese Weise wird die weitere Substrataufnahme reduziert oder gestoppt.

Es gibt noch einige weitere Beispiele bei *Archaea*, wo überschüssige Glucose ebenfalls zu einer Repression der Genexpression führt. So wird in *Sulfolobus solfataricus* die Expression von Stärkehydrolasen reprimiert, wenn sich Glucose in der Zelle anhäuft (Haseltine *et al.*, 1996). Ferner konnte gezeigt werden, dass die Induktion des Arabinose ABC-Transporters verhindert wird, wenn *S. solfataricus* in Anwesenheit von Glucose wächst (Lubelska *et al.*, 2006). Der Einfluss von Glucose auf die Verwendung anderer Kohlenstoffquellen über die Modulation der Aktivität eines Transkriptionsregulators erinnert an die Katabolit-Repression in *Bacteria*, wo Glucose die Expression von Transportern alternativer Kohlenstoffquellen über das PEP-abhängige Phosphotransferase-System (PTS) beeinflusst (Postma *et al.*, 1993). Durch die spezifischen Eigenschaften von TrmB lässt sich die Substrataufnahme in *P. furiosus* jedoch auch ohne PTS effektiv regulieren.

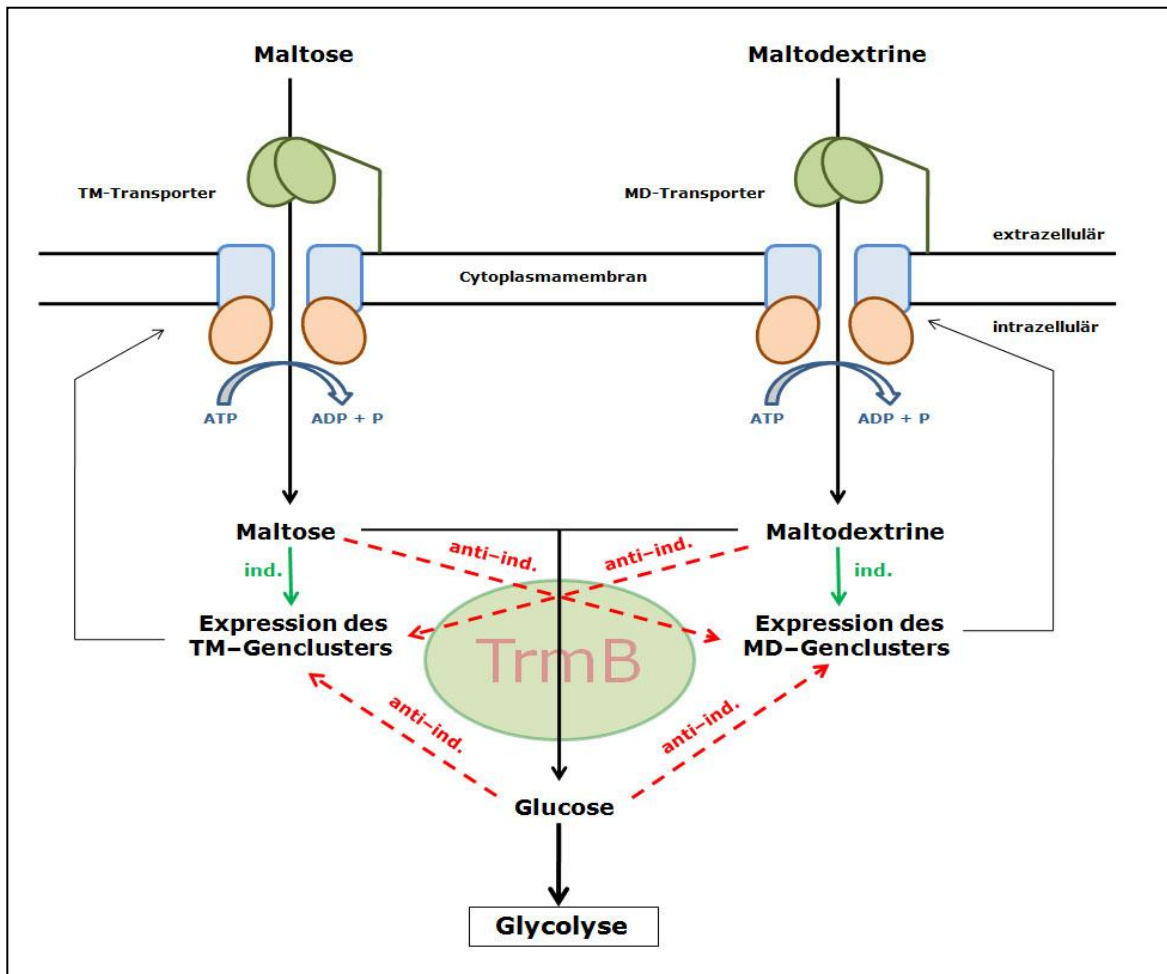


Abb.57: Anti-Induktion des TM- und MD-Systems im Zusammenhang mit TrmB.

Sammelt sich Glucose in der Zelle an, kommt ihr co-repressiver Effekt im Zusammenhang mit TrmB zum Tragen und die Expression des TM- und MD-Genclusters wird trotz Anwesenheit der jeweiligen Induktoren gehemmt. Auf diese Weise wird die weitere Substrataufnahme gedrosselt. Neben Glucose wirken die Induktoren des MD-Systems anti-induktorisch auf das TM-System und umgekehrt. Rote Pfeile zeigen einen anti-induktorischen Effekt (anti-ind.), grüne Pfeile einen induktorisches Effekt (ind.) an.

Des Weiteren konnte mit entsprechenden *in vitro* Transkriptionsversuchen festgestellt werden, dass nicht nur Glucose im Zusammenhang mit TrmB als Co-Repressor fungiert. Der Induktor des TM-Systems, Maltose, wirkt ebenfalls als Anti-Induktor auf die Transkription am MD-Genclusters. Die durch Maltotriose induzierte Transkription am MD-Promotor wurde durch Zugabe von Maltose wieder vollständig gehemmt. Maltose ist dabei am MD-Promotor ein ebenso starker Co-Repressor wie Glucose (Maltotriose/Maltose-Verhältnis 2:1). Umgekehrt gilt dasselbe für die Induktoren des MD-Promotors, die als Anti-Induktoren auf die Transkription am TM-Promotors wirken. So wurde die durch Maltose induzierte Transkription am TM-

Promotor durch Zugabe von Maltotriose bzw. Sucrose wieder reprimiert. Der anti-induktorische Effekt ist hier aber deutlich schwächer als bei Glucose (Maltose/Maltotriose bzw. Sucrose-Verhältnis 1:10).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass TrmB die Signale verschiedener Zucker im Cytoplasma interpretieren und entsprechend darauf reagieren kann. In Abhängigkeit vom jeweiligen Promotor wird TrmB also durch spezifische Induktoren inaktiviert und vom Promotor gelöst, während spezifische Anti-Induktoren die Bindung des Repressors an die DNA verstärken. Darüber hinaus kann TrmB promotorabhängig auf ein und dasselbe Substrat unterschiedlich reagieren.

2. TrmBL1 ist ein multifunktionaler Regulator des Zuckerstoffwechsels in *P. furiosus*

Neben TrmB stellte die Charakterisierung des Regulators TrmBL1 aus *P. furiosus* einen zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei TrmBL1 um einen multifunktionalen Transkriptionsregulator des Zuckerstoffwechsels in *P. furiosus* handelt, der bei der Regulation von Glycolyse, Gluconeogenese und Zuckertransport eine tragende Rolle spielt und auch seine eigene Expression autoreguliert.

2003 wurde von Schut *et al.* mit Hilfe von DNA Microarray Analysen eine Untersuchung der genomweiten Genexpression von *P. furiosus* Zellen durchgeführt, die einerseits auf Kohlenhydraten und andererseits auf Peptiden als primäre Kohlenstoffquelle gezogen wurden. Dabei konnte festgestellt werden, dass Gene glycolytischer Enzyme deutlich stärker exprimiert wurden, wenn die Zellen auf Maltose wuchsen. Die Expression von Genen gluconeogenetischer Enzyme wurde dagegen bei Wachstum auf Peptiden deutlich hochreguliert. Diese Beobachtungen ließen auf eine Kontrolle von Glycolyse und Gluconeogenese auf Transkriptionsebene schließen.

Der Regulator TrmBL1 erkennt im Promotorbereich von Genen, die für Enzyme der Glycolyse und Gluconeogenese kodieren, das TGM-Motiv als Zielsequenz (van de Werken *et al.*, 2006). Lee *et al.* zeigte 2007 in EMSA-Experimenten, dass TrmBL1 an glycolytische Promotoren binden kann und einen DNA-Shift verursacht. Während dieser Arbeit wurde deshalb die Rolle von TrmBL1 in der Transkriptionsregulation des glycolytischen Phosphofructokinase (PFK)-Gens sowie des gluconeogenetischen Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase)-Gens näher untersucht.

Um die molekulare Wechselwirkung von TrmBL1 mit dem PFK-Promotor zu bestimmen, wurden DNaseI Footprinting-Experimente durchgeführt. Die TrmBL1-Bindestelle befindet sich demnach stromabwärts der BRE/TATA-Box zwischen Transkriptions- und Translationsstart und überlappt mit dem TGM-Motiv (Abb. 58a). *In vitro* Transkriptionsversuche am PFK-Promotor mit TrmBL1 belegten, dass die Bindung des Regulators zu einer Transkriptionsrepression am PFK-Promotor führt (vgl. Abb. 26A). Bei Einsatz von 6,2 nM Promotor-Matrize wurde die Transkription ab 1,0 µM TrmBL1 vollständig gehemmt (DNA/TrmBL1-Verhältnis 1:160). In Anbetracht der Position der TrmBL1-Bindestelle im Bereich des Transkriptionsstarts wird bei Anlagerung des Regulators hier höchstwahrscheinlich die Rekrutierung der RNAP verhindert und so die Transkription inhibiert. Mit Hilfe von Transkriptionsversuchen in Anwesenheit verschiedener Zucker konnte festgestellt werden, dass TrmBL1 ein breites Substratspektrum besitzt. Maltose, Maltotriose und Fructose wirkten hier als Induktoren und konnten die TrmBL1-vermittelte Transkriptionshemmung am PFK-Promotor wieder aufheben (vgl. Abb. 27).

Auffällig war dabei, dass sich die Induktor-Wirkung der genannten Zucker nicht wie erwartet kontinuierlich mit steigenden Zuckerkonzentrationen entfaltete, wie dies z.B. bei TrmB am TM- und MD-Promotor zu beobachten war. Stattdessen konnte ein konzentrationsabhängiges, wellenförmiges Induktionsmuster mit jeweils einem Induktionsmaximum bei 0,25 und 10,00 mM Zucker beobachtet werden (vgl. Abb. 27A und B). Die Maxima ergaben sich also bei einem TrmBL1/Zucker-Verhältnis von 1:250 und 1:10000. Die Vermutung, dass dieses Phänomen eventuell durch ungünstige Versuchsbedingungen verursacht wurde, bestätigte sich nicht. Auch unter mehrfach geänderten Bedingungen blieb das wellenförmige Induktionsmuster bestehen. Es konnte hier lediglich eine leichte Verschiebung der Induktionsmaxima hin zu niedrigeren Zuckerkonzentrationen beobachtet werden (vgl. Abb. 28A und B). Der wellenförmige Effekt musste demnach in direktem Zusammenhang mit der Regulation durch TrmBL1 stehen.

Die Ergebnisse von Gelfiltrationsexperimenten mit TrmBL1 in Anwesenheit verschiedener Zuckerkonzentrationen, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Boos in Konstanz durchgeführt wurden, könnten eine Erklärung für dieses Phänomen liefern. Dort wurde eine Änderung der Quartiärstruktur von TrmBL1 in Abhängigkeit von der Zuckerkonzentration beobachtet (Lee *et al.*, 2007b). In geeignetem Puffer und in Abwesenheit von Kohlenhydraten lag TrmBL1 hauptsächlich in tetramerer Form (148,8 kDa) und zu geringer Menge in oktamerer Form (271,3 kDa) vor. Bei Zugabe höherer Konzentrationen Maltotriose (ab 1,0 mM) bzw. Maltose (ab 5,0 mM) überwog jedoch die oktamere Form, während TrmBL1 bei niedrigen Zuckerkonzentrationen (unter 1,0 mM) als Tetramer vorlag. Das beobachtete, wellenförmige

Induktionsmuster könnte deshalb auf eine unterschiedliche Bindeaffinität der tetrameren und oktameren Form von TrmBL1 zur Promotor-DNA zurückzuführen sein. Demnach würde die tetramere Form im Vergleich zur oktameren Form eine geringere Affinität zum Promotor aufweisen, was zu folgendem Induktionsmodell führt: In Abwesenheit von Zucker bindet das tetramere TrmBL1 zwar gut an die DNA und hemmt die Transkription, lässt sich aber schon von relativ geringen Zuckerkonzentrationen wieder vom Promotor lösen; die Transkription wird induziert. Bei mittleren bis höheren Zuckermengen bildet sich die oktamere Form des Regulators, die wieder an den Promotor bindet und die Transkription inhibiert, da sie eine höhere Affinität zur Promotor-DNA besitzt als das TrmBL1-Tetramer. Erst bei noch höheren Zuckerkonzentrationen löst sich das oktamere TrmBL1 vom Promotor, wodurch die Transkription erneut induziert wird. Mit diesem Modell lassen sich das wellenförmige Induktionsmuster und der Induktionseinbruch bei mittleren Zuckerkonzentrationen erklären. Eine detaillierte EMSA-Analyse von DNA- und Zuckerbindeaffinität der multimeren Form von TrmBL1 könnte mehr Licht in dieses interessante Phänomen bringen.

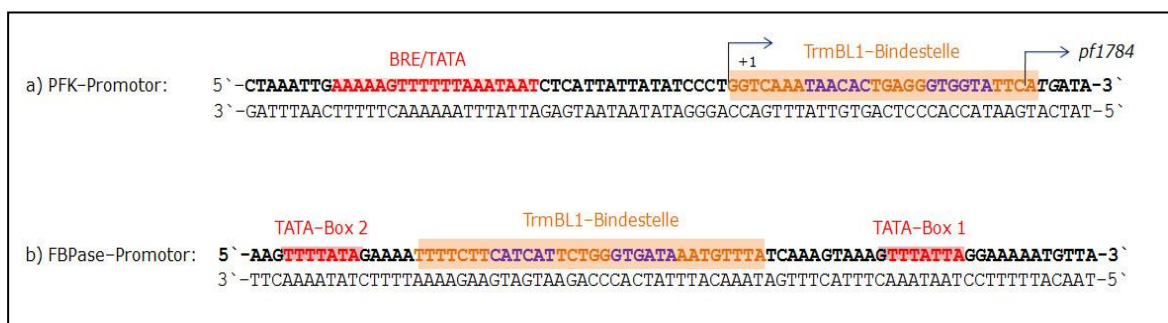


Abb.58: Position der TrmBL1-Bindestelle an PFK- und FB Pase-Promotor.

Ein Vergleich der Promotorregionen des Phosphofructokinase (PFK)- und des Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase)-Gens zeigt, dass sich die TrmBL1-Bindestelle (orange dargestellt) und das TGM-Motiv (lila hervorgehoben) beim glycolytischen PFK-Promotor (a) stromabwärts und beim gluconeogenetischen FB Pase-Promotor (b) stromaufwärts der BRE/TATA-Box (rot dargestellt) befindet.

Da die Promotoren von Genen gluconeogenetischer Enzyme ebenfalls das TGM-Motiv aufweisen, wurde untersucht, ob TrmBL1 auch hier als Transkriptionsregulator wirkt. Dazu wurden entsprechende *in vitro* Experimente am Promotor des Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase)-Gens durchgeführt. Die Promotorregion des FB Pase-Gens besitzt zwei TATA-Boxen mit jeweils einem eigenen Transkriptions- und Translationsstart (vgl. Abb. 39; Gindner, 2009). Bei der basalen Transkription ohne Regulator erhält man folglich auch zwei Produkte unterschiedlicher Länge. Es besteht

die Vermutung, dass hier zwei Proteine mit unterschiedlich langen N-Termini gebildet werden. Der funktionelle Hintergrund des Längenunterschieds ist bisher noch unklar. DNaseI Footprinting-Experimente haben bestätigt, dass TrmBL1 auch hier im Bereich des TGM-Motivs an den Promotor bindet, das sich stromaufwärts der TATA-Box 1 befindet (Abb. 58b). Damit ist die TrmBL1-Bindestelle des FB Pase-Promotors genau zwischen den beiden TATA-Boxen lokalisiert. *In vitro* Transkriptionsversuche mit steigenden Konzentrationen TrmBL1 gaben Hinweise darauf, dass TrmBL1 die Transkription des Hauptproduktes (TATA-Box 1) aktiviert. Die stimulierende Wirkung von TrmBL1 war jedoch nur bei relativ geringen Regulator-Mengen reproduzierbar (vgl. Abb. 41 und 42). So konnte bei 50 und 75 nM TrmBL1 ein leicht aktivierender Effekt festgestellt werden (DNA/TrmBL1-Verhältnis 1:8 bzw. 1:12). Bei höheren TrmBL1-Konzentrationen war die Transkriptionsaktivität jedoch starken Schwankungen unterworfen.

Primer Extension Versuche belegten, dass in *P. furiosus* Zellen, die auf Pyruvat gezogen werden, deutlich mehr FB Pase-mRNA gebildet wird, als in Zellen, die auf Stärke wachsen (Gindner, 2009). Bei Wachstum auf Pyruvat werden Gene der Gluconeogenese demnach aktiviert. Die Vermutung, Pyruvat könnte sich als Ausgangssubstrat der Gluconeogenese stabilisierend auf die TrmBL1-vermittelte Aktivierung am FB Pase-Promotor auswirken, bestätigte sich jedoch nicht. (vgl. Abb. 42).

Im Zusammenhang mit der aktivierenden Regulation von TrmBL1 am FB Pase-Promotor wird ein ähnlicher Mechanismus vermutet wie beim Regulator Ptr2 aus *Methanococcus jannaschii*, der die Transkription am *rb2*-Promotor durch eine Erleichterung der TBP-Rekrutierung aktiviert (Ouchammouch *et al.*, 2003; vgl. Tab. 1). Dabei bindet Ptr2 wie TrmBL1 an eine zweiteilige, palindromische Konsensussequenz (UAS), die dem TGM-Motiv ähnlich ist und sich ebenfalls stromaufwärts der BRE/TATA-Box befindet. Um festzustellen, ob die TrmBL1-vermittelte Aktivierung am FB Pase-Promotor ebenfalls auf eine Unterstützung der Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren zurückzuführen ist, wurden *in vitro* Transkriptionsversuche mit suboptimalen TBP- und TFB-Konzentrationen durchgeführt (vgl. Abb. 43). Wurde die Konzentration beider Faktoren gleichzeitig herabgesetzt, konnte tatsächlich eine Verstärkung des aktivierenden Effekts von TrmBL1 beobachtet werden. Die Transkriptionsaktivierung scheint also auch hier auf eine Unterstützung der Rekrutierung von TBP und TFB zurückzuführen zu sein. Mittlerweile konnte außerdem durch Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)-Analysen bestätigt werden, dass die Expression des FB Pase-Gens bei Bindung von TrmBL1 an den FB Pase-Promotor *in vivo* hochgefahren wird (Reichelt, 2009).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten belegen, dass es sich bei TrmBL1 um einen globalen Regulator am Kreuzungspunkt von Glycolyse und Gluconeogenese handelt. Er nimmt dabei eine duale Rolle als Repressor der Glycolyse und als Aktivator der Gluconeogenese ein. TrmBL1 teilt diese Eigenschaft mit dem homologen Regulator Tgr aus *T. kodakaraensis*, der ebenfalls das TGM-Motiv als Zielsequenz erkennt und reprimierend bzw. aktivierend auf die Transkription glycolytischer bzw. gluconeogenetischer Gene einwirkt (Kanai *et al.*, 2007).

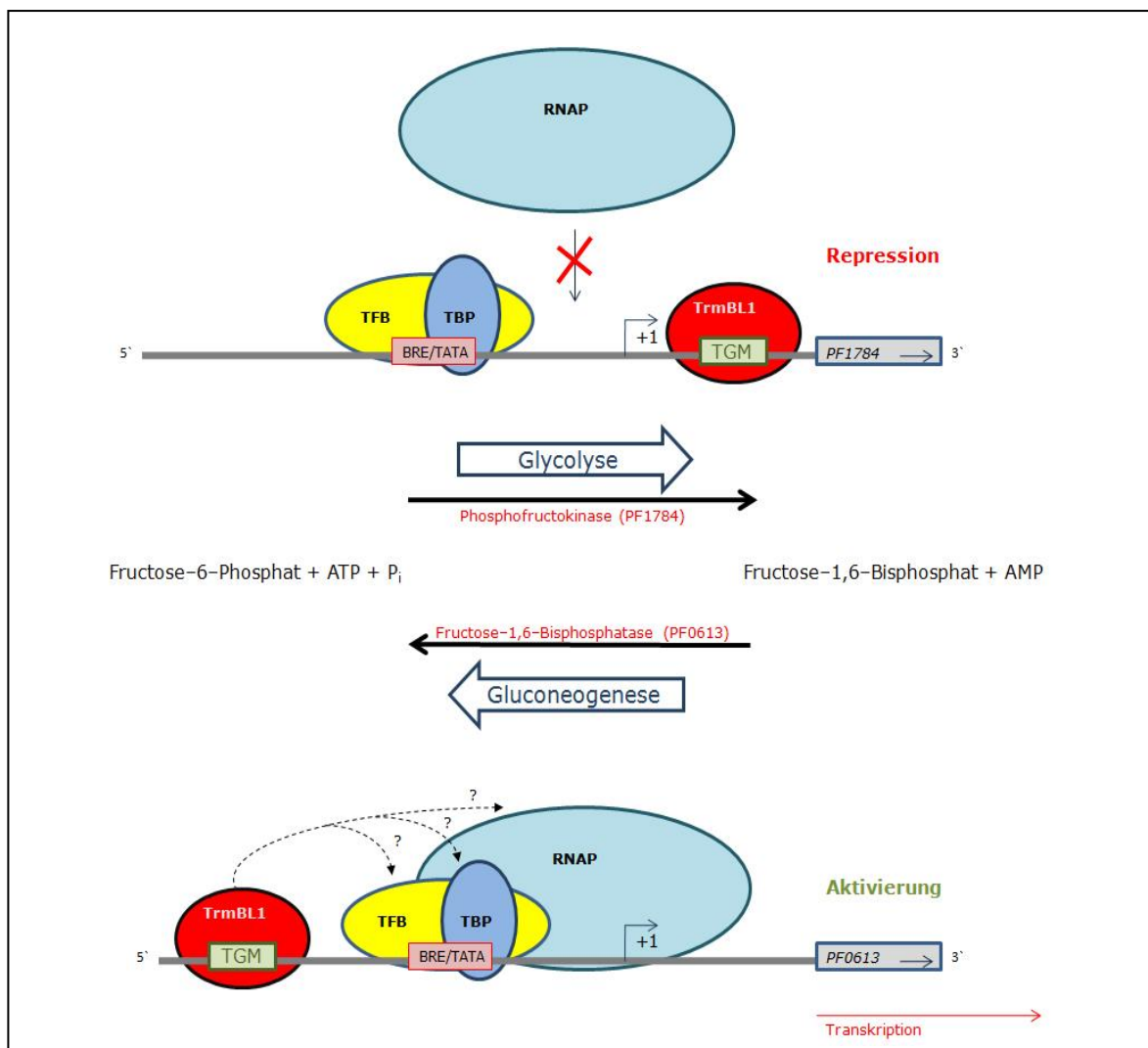


Abb.59: Modell zum Regulationsmechanismus von TrmBL1.

Für die Expression des glycolytischen Enzyms Phosphofructokinase wirkt TrmBL1 als Repressor. Der zwischen Transkriptions- und Translationsstart gebundene Regulator verhindert die Rekrutierung der RNAP und inhibiert so die Transkription. Für die Expression des gluconeogenetischen Enzyms Fructose-1,6-Bisphosphatase wirkt TrmBL1 dagegen aktivierend. Hier befindet sich das TGM-Motiv stromaufwärts der BRE/TATA-Box und der gebundene Regulator erleichtert vermutlich die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und RNAP. Die Position der TrmBL1-Bindestelle relativ zur BRE/TATA-Box bestimmt demnach die Regulationsweise von TrmBL1. (nach Lee *et al.*, 2008)

Die Position des TGM-Motivs in Bezug auf die BRE/TATA-Box eines Promotors scheint dabei zu bestimmen, ob TrmBL1 die Transkription als Repressor oder Aktivator reguliert (Abb. 58 und 59). Befindet sich das TGM-Motiv und damit die TrmBL1-Bindestelle stromabwärts der BRE/TATA-Box im Bereich des Transkriptionsstarts wie es beim glycolytischen PFK-Promotor der Fall ist, wird durch Bindung von TrmBL1 die Rekrutierung der RNAP verhindert und die Transkription reprimiert. Ist das TGM-Motiv wie beim gluconeogenetischen FB Pase-Promotor jedoch stromaufwärts der BRE/TATA-Box lokalisiert, wird die Ausbildung des Initiationskomplexes nicht behindert. Die Bindung von TrmBL1 erleichtert hier vielmehr die Rekrutierung der Transkriptionsfaktoren und die Transkription wird aktiviert. Je nach Position des TGM-Motivs kommt es bei der Bindung von TrmBL1 also zur Repression oder Aktivierung der Transkription (Lee *et al.*, 2008). Dies geht auch mit der Beobachtung konform, dass die Transkription des Nebenprodukts am FB Pase-Promotor durch TrmBL1 insgesamt reprimiert wird (vgl. Abb. 41B). Die TrmBL1-Bindestelle mit dem TGM-Motiv befindet sich zwischen den beiden TATA-Boxen des FB Pase-Promotors und damit stromabwärts von TATA-Box 2. Bei Bindung von TrmBL1 wird deshalb vermutlich die Rekrutierung der RNAP für TATA-Box 2 und damit die Transkription des Nebenprodukts verhindert.

Obwohl TrmBL1 an allen bisher getesteten Promotoren mit TGM-Motiv als Transkriptionsregulator identifiziert werden konnte und das TGM hier auch als Zielsequenz für den Regulator fungiert, legen Transkriptionversuche am TrmBL1-Promotor selbst nahe, dass das TGM nicht essentiell für die Promotorerkennung durch TrmBL1 ist. TrmBL1 hemmte die Transkription am eigenen Promotor mit einer ähnlichen Effizienz wie am PFK-Promotor (DNA/TrmBL1-Verhältnis 1:200; vgl. Abb. 30), obwohl das TGM-Motiv im TrmBL1-Promotor fehlt. TrmBL1 autoregulierte demnach seine eigene Synthese. Auf der Suche nach Effektoren für TrmBL1 am eigenen Promotor konnte Glucose als Induktor identifiziert werden (vgl. Abb. 31). Im Gegensatz zu TrmB, wo Glucose die Bindung des Regulators an die Zielpromotoren verstärkt und somit als Anti-Induktor wirkt, vermag Glucose im Zusammenhang mit TrmBL1 also den Regulator wieder von der DNA zu lösen und so die Transkription zu initiieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass TrmB und TrmBL1 einzigartige Eigenschaften teilen, die sie von allen bisher beschriebenen, prokaryotischen Regulatoren unterscheiden: Sie erkennen unterschiedliche Bindesequenzen an verschiedenen Promotoren und zeigen eine ausgeprägte, promotorabhängige Substratspezifität. Darüber hinaus nimmt TrmBL1 eine duale Rolle als Repressor und Aktivator ein.

3. TrmB und TrmBL1 besitzen zwei DNA-Bindehelices

Eine Mutationsanalyse der DNA-Bindedomänen von TrmB und TrmBL1 enthüllte eine weitere, einzigartige Eigenschaft dieser bemerkenswerten Regulatorproteine. Sie erkennen und binden ihre verschiedenen Zielpromotoren mit unterschiedlichen Helices innerhalb ihrer DNA-Bindedomänen.

Eine nähere Betrachtung der DNA-Bindedomäne von TrmB ließ vermuten, dass dieser Regulator mindestens zwei potentielle Helix-Turn-Helix-Strukturen besitzt. Es stellte sich deshalb die Frage, ob TrmB die verschiedenen Bindestellen seiner Zielpromotoren auch mit unterschiedlichen Helices innerhalb der DNA-Bindedomäne erkennt. EMSA- und *in vitro* Transkriptionsversuche am TM- und MD-Promotor, sowie DNaseI Footprinting-Experimente am TM-Promotor mit TrmB-Mutanten, welche verschiedene Punktmutationen innerhalb der potentiellen HTH-Strukturen aufwiesen, konnten diese Theorie bestätigen (vgl. Abb. 45, 46, 47 und 48). Die gewonnenen Daten belegen, dass die HTH 1-Struktur (AS 33–54) an der Bindung des TM-Promotors beteiligt ist, wobei Tyrosin an Position 50 eine entscheidende Rolle spielt. So hatte die Mutante TrmB Y50N die Fähigkeit, an den TM-Promotor zu binden, nahezu vollständig verloren, während die Bindung an den MD-Promotor nicht beeinträchtigt wurde. Die HTH 2-Struktur (AS 83–104) ist im Gegensatz dazu für die Bindung an den MD-Promotor von Wichtigkeit. Hier ist das Glutamat an Position 87 ausschlaggebend. Die Mutante TrmB E87A war nicht mehr in der Lage, an den MD-Promotor zu binden, während die Affinität für den TM-Promotor unverändert blieb. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die HTH 1-Struktur von TrmB für die Bindung an den TM-Promotor zuständig ist, während der MD-Promotor über die HTH 2-Struktur erkannt und gebunden wird. Entsprechende EMSA- und Transkriptionsversuche am Doppelpromotor TMMD, der beide TrmB-Bindestellen besaß, konnten diese These bestätigen (vgl. Abb. 50 und 51). Die dimere Struktur von TrmB, welche mittlerweile aufgeklärt werden konnte (W. Welte, W. Boos), enthüllte, dass es sich nur bei der HTH 1-Struktur, um ein klassisches HTH-Motiv handelt. Die HTH 2-

Struktur wird dagegen von einer großen Helix gebildet, die bei der Dimerisierung eine Rolle spielt (Abb. 60).

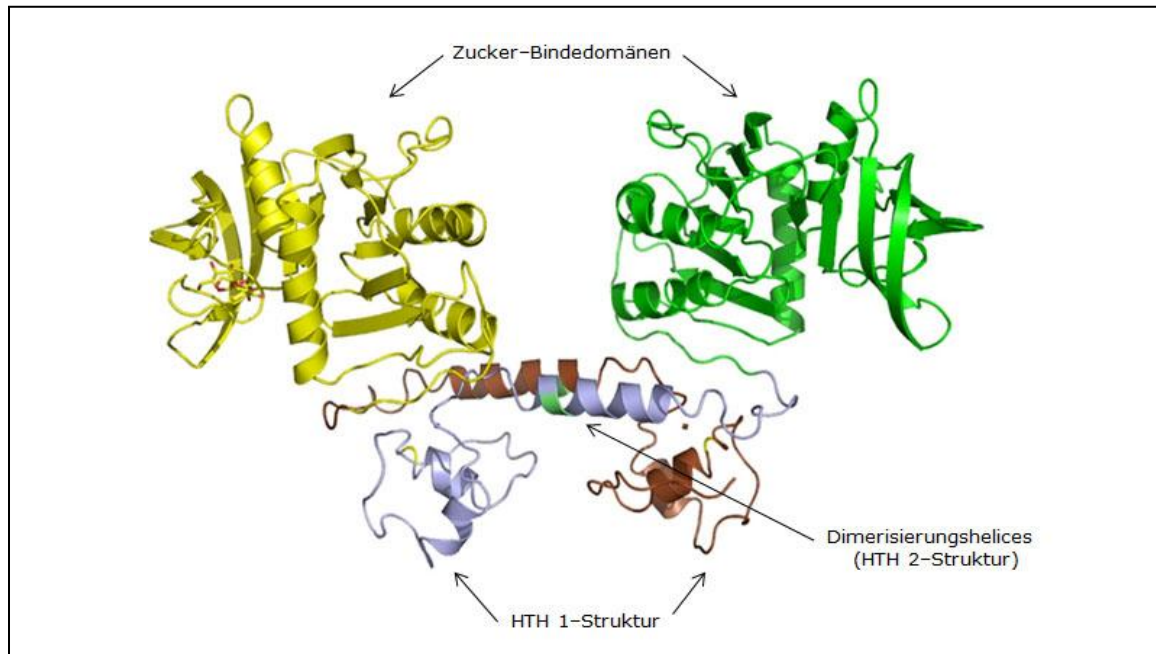


Abb.60: Dimere Struktur von TrmB.

Die HTH 1-Struktur, die für die Bindung an den TM-Promotor verantwortlich ist, wird von einem klassischen HTH-Motiv gebildet. Bei der HTH 2-Struktur, die bei der Bindung an den MD-Promotor eine tragende Rolle spielt, handelt es sich dagegen um eine Dimerisierungshelix. (nach W. Welte und W. Boos)

Da TrmBL1 gerade innerhalb der DNA-Bindedomäne große Homologien zu TrmB aufweist und ebenfalls unterschiedliche Bindesequenzen erkennen kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob auch TrmBL1 mehrere Bindehelices besitzt. Auch diese Vermutung konnte bestätigt werden. So wiesen EMSA-, DNaseI-Footprinting- und Transkriptionsversuche am PFK-, FBPase- und TrmBL1-Promotor nach, dass TrmBL1 mit unterschiedlichen Helices an Promotoren mit und ohne TGM-Motiv bindet. Die Mutanten TrmBL1 E40N und TrmBL1 D50N, welche Punktmutationen innerhalb der HTH 1-Struktur (AS 32-53) aufwiesen, hatten ihre Affinität zu Promotoren mit TGM-Motiv verloren, während die Bindung an den TrmBL1-Promotor (ohne TGM) nicht beeinträchtigt wurde. Die HTH 2-Struktur (AS 80-99) scheint dagegen bei der Bindung an Promotoren ohne TGM-Motiv eine entscheidende Rolle zu spielen. TrmBL1 E81A und TrmBL1 ED85AA waren nicht mehr in der Lage an den TrmBL1-Promotor zu binden, während Promotoren mit TGM-Motiv nach wie vor erkannt wurden.

4. TrmB und TrmBL1 stehen im Zentrum eines komplexen Regulationsnetzwerks innerhalb des Zuckermetabolismus von *P. furiosus*

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse belegen, dass es sich bei TrmB und TrmBL1 um globale, zuckersensitive Transkriptionsregulatoren handelt, welche sowohl Gene des Zucker-Transportsystems als auch Gene zuckermetabolisierender Enzyme der Glycolyse und Gluconeogenese kontrollieren.

Darüber hinaus konnte mittels *in vitro* Experimenten bewiesen werden, dass TrmBL1 die Zielpromotoren von TrmB erkennt und umgekehrt. Wie in Kap. III, 1.5. beschrieben, wird die Expression des MD-Transporters von TrmB negativ reguliert und in diesem Zusammenhang nur von Maltodextrinen und Sucrose induziert. Interessanterweise kam es *in vivo* aber auch bei Wachstum auf Maltose zu einer Induktion des MD-Systems, obwohl TrmB Maltose hier nicht als Induktor erkennt und der MD-Transporter nur Maltodextrine transportieren kann (DiRuggiero *et al.*, 2000). Zunächst ging man davon aus, dass *in vivo* der Induktor Maltotriose mit Hilfe spezifischer Enzyme aus Maltose gebildet wird und so der co-repressive Effekt von Maltose am MD-Promotor überlagert werden könnte. Während dieser Arbeit konnte jedoch festgestellt werden, dass Maltose in Zusammenhang mit TrmBL1 tatsächlich ein Induktor für das MD-System ist. DNaseI Footprinting- und *in vitro* Transkriptionsversuche belegten, dass TrmBL1 mit hoher Affinität an den MD-Promotor bindet und so die Transkription inhibiert. Die TrmBL1-Bindestelle befindet sich stromabwärts der BRE/TATA-Box im Bereich des Transkriptionsstarts und überlappt mit einem TGM-Motiv und der TrmB-Bindestelle (vgl. Abb. 36). Bei Bindung von TrmBL1 wird vermutlich auch hier die Rekrutierung der RNAP verhindert und so die Transkription gehemmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass TrmBL1 die Transkription am MD-Promotor im Vergleich zu TrmB mit einer 4fach höheren Effizienz reprimiert (DNA/TrmBL1-Verhältnis 1:60; vgl. Abb. 37A). Die TrmBL1-vermittelte Hemmung der Transkription konnte durch Maltose wieder aufgehoben werden, was die *in vivo* Daten bestätigte: Maltose fungiert am MD-Promotor tatsächlich auch als Induktor (vgl. Abb. 38A). Somit kann Maltose in Abhängigkeit des beteiligten Regulators am MD-Promotor entweder als Induktor oder als Co-Repressor wirken. Das eigentliche Substrat des MD-Transporters, Maltodextrine, besaß für TrmBL1 jedoch keine Induktor-Wirkung. Die deutlich höhere Bindeaffinität von TrmBL1 am MD-Promotor sowie das Vorhandensein des TGM-Motivs legen aber die Vermutung nahe, dass TrmBL1 und nicht TrmB der eigentliche Regulator des MD-Systems sein könnte.

Der TM-Promotor, ein weiterer Zielpromotor von TrmB, wird ebenfalls von TrmBL1 erkannt und gebunden. Auch hier verursacht TrmBL1 eine Hemmung der Transkription mit Maltose als Induktor (vgl. Abb. 38B). TrmBL1 reprimiert hier die Transkription jedoch mit 4fach geringerer Effizienz als TrmB (vgl. Abb. 37B). Die Bindung von TrmBL1 an den TM-Promotor ist ein weiterer Hinweis darauf, dass das TGM-Motiv für TrmBL1 nicht essentiell zur Promotorerkennung ist.

Ferner belegen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten, dass TrmB neben dem TM- und MD-System auch an der Kontrolle von Genen beteiligt ist, die für Enzyme des Zuckerstoffwechsels kodieren und damit Zielpromotoren von TrmBL1 mitreguliert, indem es deren Transkription inhibiert. Dies lässt auf ein weitverzweigtes Regulationsnetzwerk innerhalb des Zuckerstoffwechsels von *P. furiosus* schließen, in dessen Zentrum die Regulatoren TrmB und TrmBL1 stehen (Abb. 61 und 62).

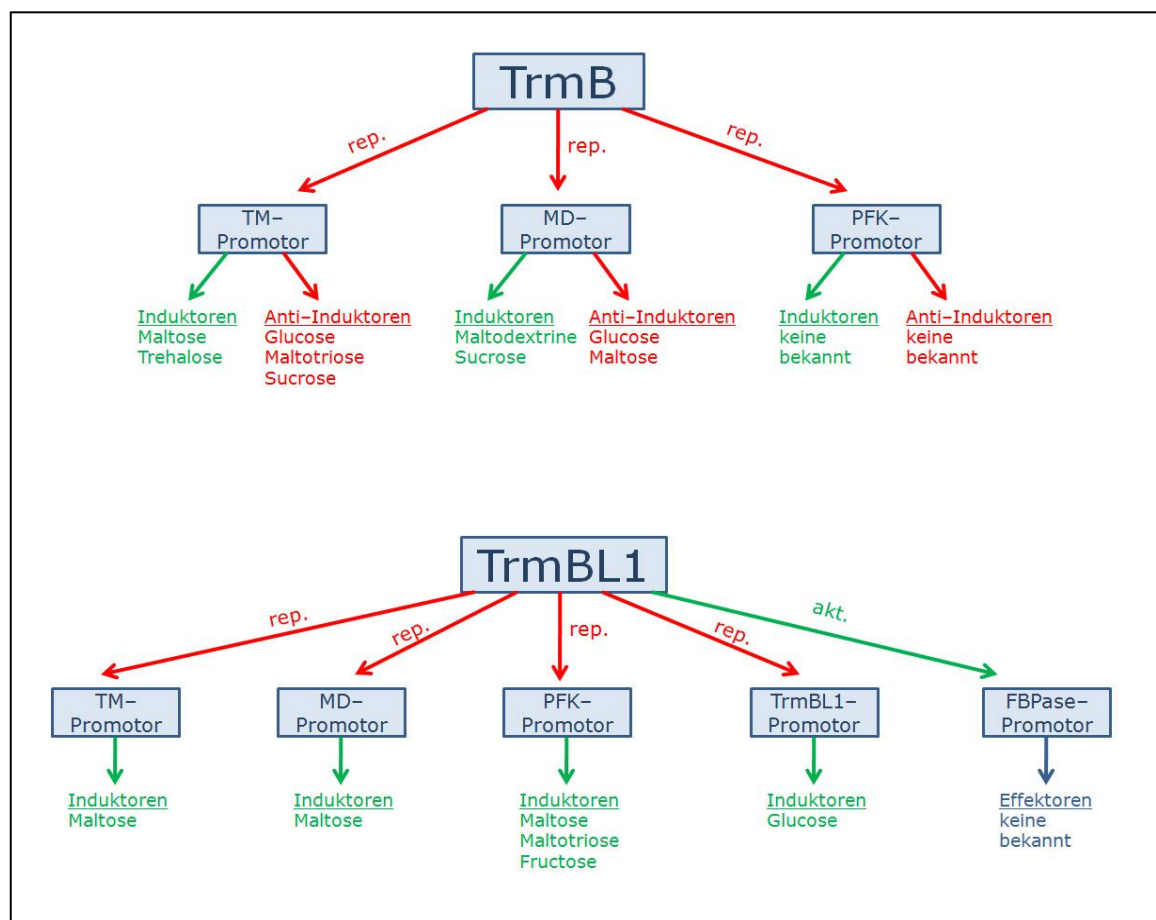


Abb.61: Zielpromotoren und Effektoren von TrmB und TrmBL1 im Überblick.

Induktoren sind grün, Anti-Induktoren rot dargestellt. Rote Pfeile weisen auf eine reprimierende (rep.), grüne Pfeile auf eine aktivierende (akt.) Wirkung des entsprechenden Regulators hin.

Dieses Regulationsnetzwerk scheint sehr komplex zu sein. Deshalb sollen im Folgenden die wichtigsten, bisher gewonnenen Daten noch einmal zusammengefasst werden: Bei Abwesenheit von entsprechenden Substraten wird die Expression des TM- und MD-Transporters von TrmB und TrmBL1 gehemmt. Sobald geeignetes Substrat vorhanden ist, wird die Expression beider Systeme induziert und so die Aufnahme von Substrat in die Zelle ermöglicht. Dabei ist Maltose für beide Transportsysteme ein Induktor, während Maltodextrine und Sucrose ausschließlich für das MD-System und Trehalose nur für das TM-System als Induktoren fungieren. Das über die entsprechenden Transporter in die Zelle aufgenommene Substrat wird im Cytoplasma über den Dextrin-Stoffwechsel zu Glucose abgebaut, die ihrerseits Ausgangssubstrat für die Glycolyse ist. Ist ein Überangebot an Kohlenhydraten im Medium zur Aufnahme vorhanden, häuft sich Glucose in der Zelle an, die dann in Zusammenhang mit TrmB anti-induktorisch für TM- und MD-System wirkt. Dies führt dazu, dass TrmB auch bei Anwesenheit des entsprechenden Substrats an TM- und MD-Promotor gebunden bleibt. Auf diese Weise wird die weitere Substrataufnahme gedrosselt. Auch Maltose, Maltodextrine und Sucrose führen bei höheren Konzentrationen zu einer Anti-Induktion der Transportsysteme. Ist kein Substrat vorhanden, wird die Expression glycolytischer Enzyme durch TrmB und TrmBL1 gehemmt. Für TrmBL1 wirken hier Maltose, Maltodextrine und Fructose als Induktoren. Sobald also Substrat zur Verfügung steht, werden die Enzyme der Glycolyse exprimiert und Glucose zu Pyruvat abgebaut.

Ferner autoreguliert TrmBL1 seine eigene Expression, indem der Regulator an den eigenen Promotor bindet und die Transkription dort reprimiert. Als Induktor fungiert hier Glucose, deren Anwesenheit somit die Expression von TrmBL1 stimuliert. TrmBL1 aktiviert seinerseits die Expression von Enzymen der Gluconeogenese und somit die Bildung von Glucose aus Pyruvat.

Die Glucose-Konzentration im Cytoplasma spielt demnach eine entscheidende Rolle in der Regulation von Zuckertransport, Glycolyse und Gluconeogenese im Zusammenhang mit den Regulatoren TrmB und TrmBL1.

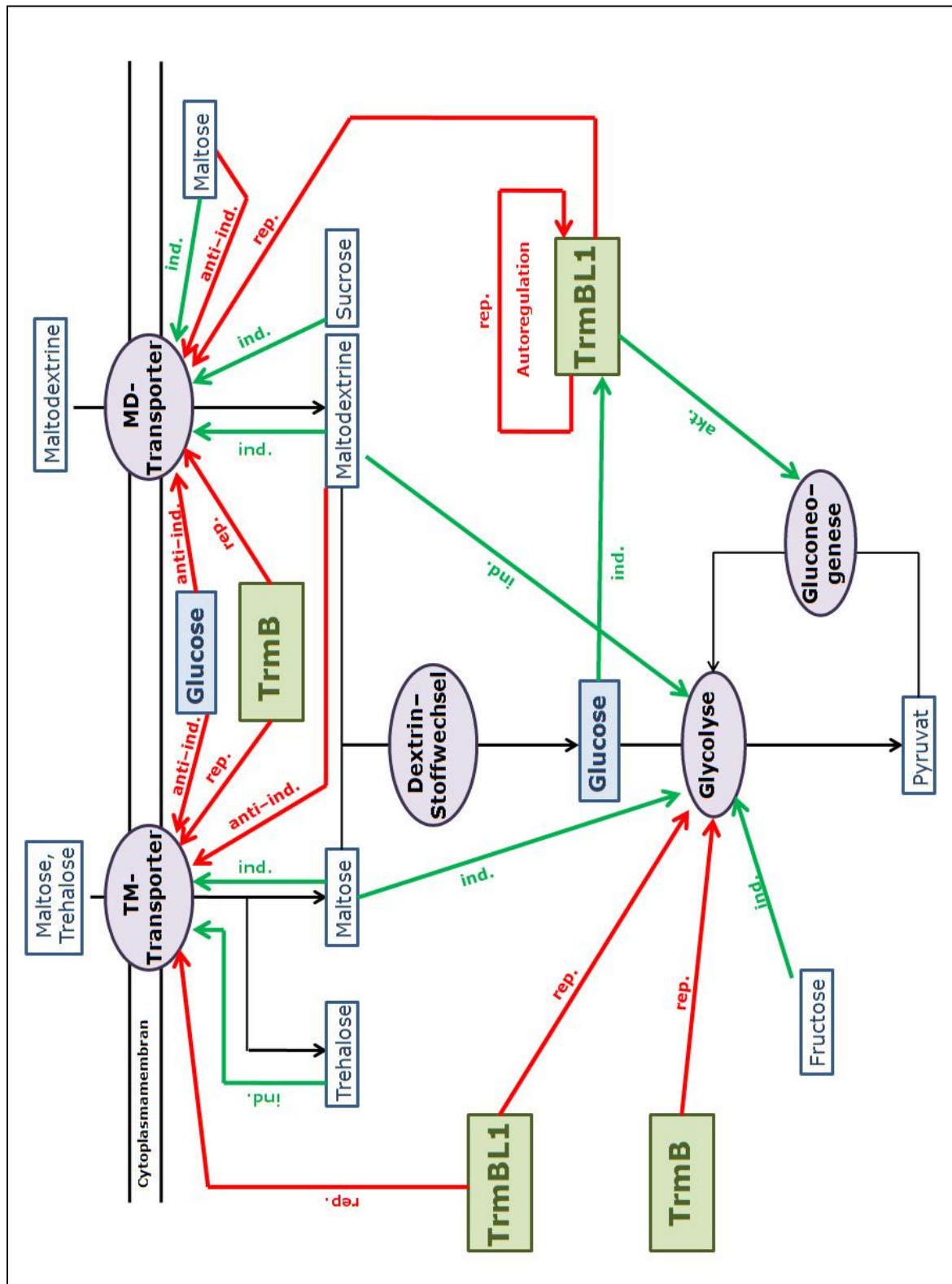


Abb.62: Modell des Regulationsnetzwerkes des Zuckerstoffwechsels in *P. furiosus*

Reprimierende (rep.) bzw. anti-induktorische (anti-ind.) Regulationswege sind mit roten Pfeilen, induzierende (ind.) bzw. aktivierende (akt.) Regulationswege sind mit grünen Pfeilen dargestellt. (vgl. auch Abb. 61).

Obwohl im Rahmen dieser Arbeit schon viel Licht ins Dunkel des Regulationsnetzwerkes von Zuckertransport- und Stoffwechsel in *P. furiosus* gebracht werden konnte, gibt es immer noch einige Unklarheiten, die zu einem vollständigen Verständnis des komplexen Regulationsmechanismus aufgeklärt werden müssen. So wird z.B. der Aktivierungsmechanismus der Gluconeogenese noch nicht vollständig verstanden. Nach den bisherigen Erkenntnissen wird die Synthese von TrmBL1 durch Glucose stimuliert, während TrmBL1 seinerseits die Bildung von Glucose stimuliert. Dies macht zwar bei Wachstum der Zellen auf Pyruvat zur Gewinnung von Glucose durchaus Sinn, würde aber im Endeffekt zu einer ungebremsten Anhäufung von Glucose in der Zelle führen. Es müssen deshalb noch weitere Faktoren an der Regulation der Gluconeogenese beteiligt sein, die bisher noch unbekannt sind.

Auch der genaue Regulationsmechanismus von TrmB an den Zielpromotoren von TrmBL1 ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bisher konnte zwar nachgewiesen werden, dass TrmB an den Promotor des glycolytischen Enzyms Phosphofructokinase bindet; es konnten jedoch noch keine Effektoren für diesen Regulator an dieser Stelle identifiziert werden.

Des Weiteren gibt es bis dato noch keine Erkenntnisse über die Regulation des Dextrin-Stoffwechsels. Im Promotorbereich der Gene für die Phospho-Zuckermutase (PF0588), sowie für drei α -Amylasen (PF0272, PF0478 und PF0477) konnte das TGM-Motiv nachgewiesen werden (Lee *et al.*, 2007b). TrmBL1 könnte also auch hier als Regulator eine Rolle spielen.

Neben TrmB und TrmBL1 besitzt *P. furiosus* schließlich noch zwei weitere Regulatoren der TrmB-Familie, TrmBL2 und TrmBL3, deren Rolle in der Regulation des Zuckerstoffwechsels noch größtenteils unbekannt ist. Bisher wurde lediglich festgestellt, dass TrmBL2 die Transkription am MD- und PFK-Promotor reprimiert und damit auch regulierend an Zielpromotoren von TrmB und TrmBL1 eingreift. Es werden jedoch nicht alle Promotoren mit TGM-Motiv von TrmBL2 erkannt (Lee *et al.*, 2007b). Sequenzanalysen belegten, dass TrmBL2 und TrmBL3 keine C-terminale Zuckerbindedomäne besitzen und somit höchstwahrscheinlich auch nicht in der Lage sind, Zucker als Substrate zu erkennen und zu binden. Für diese Regulatoren wird deshalb ein anderer Kontrollmechanismus vermutet, wie er schon im Maltose-System von *E. coli* verwirklicht ist. Dort wird der Aktivator der *mal*-Gene, MalT, durch die regulatorische Domäne der ATPase-Domäne MalK kontrolliert (Böhm und Boos, 2004). In *P. furiosus* konnte dieselbe regulatorische Domäne in den Untereinheiten des TM- und MD-Transporters gefunden werden (Diederichs *et al.*, 2000). Es besteht daher die Vermutung, dass TrmBL2 und TrmBL3 demselben Regulationsmechanismus

folgen und ihre Spezifität durch Interaktionen mit den Regulatordomänen der ABC-Transporter gewinnen könnten (Lee *et al.*, 2008).

Der Großteil der Daten über das Regulationsnetzwerk des Zuckerstoffwechsels in *P. furiosus* wurde bisher aus *in vitro* Experimenten gewonnen. Einige der erhaltenen Ergebnisse konnten zwar schon durch entsprechende *in vivo* Versuche untermauert werden, trotzdem stellt eine umfassendere Untersuchung der *in vivo* Situation sämtlicher, an der Regulation des Zuckerstoffwechsels beteiligter Regulatoren noch eine Herausforderung für die Zukunft dar.

Die überraschende Schlussfolgerung, die aus dieser Arbeit gezogen werden kann, ist die Tatsache, dass an den verschiedenen, untersuchten Promotoren eine Vielfalt regulatorischer Einflüsse durch unterschiedliche Regulatorproteine der TrmB-Familie zum Tragen kommen, die in erster Linie durch eine ausgeprägte, promotorabhängige Substratspezifität vermittelt werden. Die Erkennung der verschiedenen Zielpromotoren erfolgt dabei über mehrere Helices innerhalb der DNA-Bindedomäne des Regulatorproteins – eine einzigartige Eigenschaft, die hier zum ersten Mal für prokaryotische Regulatoren beschrieben wurde.

V. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen zur Funktionsweise der beiden zuckerspezifischen Transkriptionsregulatoren TrmB und TrmBL1 innerhalb des Zuckerstoffwechsels des hyperthermophilen Archaeons *Pyrococcus furiosus*.

Die Aufnahme von Kohlenhydraten in die Zelle wird bei *P. furiosus* von zwei substratspezifischen ABC-Transportern vermittelt. Der Maltose/Trehalose Transporter ist dabei ausschließlich für den Transport von Maltose und Trehalose zuständig, während der Maltodextrin (MD)-Transporter spezifisch für die Aufnahme von Maltodextrinen ist. Beide Transportsysteme sind auf genetischer Ebene in Genclustern zusammengefasst, deren Expression sowohl von TrmB als auch von TrmBL1 kontrolliert wird. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die beiden Regulatoren an die jeweilige Promotorregion binden und so die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren bzw. RNA-Polymerase verhindern, was zu einer Hemmung der Transkription führt. Die TrmB-vermittelte Transkriptionsrepression wird am TM-Promotor durch Maltose und Trehalose wieder aufgehoben, während Maltodextrine und Sucrose für den MD-Promotor Induktoren sind. Für TrmBL1 wirkt Maltose an beiden Promotoren als Induktor.

Neben den genannten Induktoren konnten für TrmB auch promotorspezifische Co-Repressoren identifiziert werden. Glucose wirkt am TM- und MD-Promotor als Anti-Induktor und verstärkt die Bindung des Repressors an die DNA und damit die TrmB-vermittelte Transkriptionshemmung. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Induktoren des MD-Systems, Maltotriose und Sucrose, als Anti-Induktoren am TM-System wirken und umgekehrt.

TrmBL1 ist homolog zu TrmB und reguliert die Expression von Genen, die für Enzyme der Glycolyse und der Gluconeogenese kodieren. Bei Bindung an die entsprechenden Promotorregionen erkennt TrmBL1 das palindromische TGM-Motiv als Zielsequenz und kann darüber hinaus sowohl als Repressor als auch als Aktivator wirken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass bei Bindung von TrmBL1 an die Promotorregion die Expression des glycolytischen Enzyms Phosphofructokinase (PFK) gehemmt wird. Als Induktoren wirken hier Maltose, Maltotriose und Fructose.

Im Gegensatz dazu aktiviert TrmBL1 die Transkription des PF0613-Gens, welches für das gluconeogenetische Enzym Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) kodiert. Damit fungiert TrmBL1 als Repressor der Glycolyse und als Aktivator der

Gluconeogenese. Es wird vermutet, dass die Position des TGM-Motivs stromabwärts oder stromaufwärts der BRE/TATA-Box bestimmt, ob TrmBL1 die Transkription reprimiert oder aktiviert.

DNaseI Footprinting- und *in vitro* Transkriptionsversuche bestätigten außerdem, dass auch TrmB an den PFK-Promotor binden und die Transkription dort reprimieren kann. Ferner konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass TrmBL1 auch seine eigene Synthese autoreguliert, indem es an den TrmBL1-Promotor bindet und so die Transkription reprimiert, wobei Glucose als Induktor wirkt. Da der TrmBL1-Promotor kein TGM-Motiv besitzt, lieferte dies auch den Beweis, dass diese Konsensussequenz nicht essentiell für die Promotorerkennung durch TrmBL1 ist.

Die Tatsache, dass TrmB auch an der Regulation der Zielpromotoren von TrmBL1 beteiligt ist und umgekehrt, lässt auf ein weitverzweigtes Regulationsnetzwerk innerhalb des Zuckermetabolismus von *P. furiosus* schließen, in dessen Zentrum die Regulatoren TrmB und TrmBL1 stehen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte belegt werden, dass sowohl TrmB als auch TrmBL1 einzigartige Eigenschaften besitzen, die bisher noch für keinen prokaryotischen Regulator beschrieben wurden: Beide Regulatoren erkennen unterschiedliche Nukleotidsequenzen an verschiedenen Promotoren und besitzen eine ausgeprägte, promotorabhängige Substratspezifität. Man geht davon aus, dass diese Regulatoren bei der Bindung an verschiedene Nukleotidsequenzen unterschiedliche Konformationen einnehmen und folglich auch verschiedene Zucker als Induktoren erkennen.

Eine Mutationsanalyse der DNA-Bindedomäne von TrmB und TrmBL1 enthüllte eine weitere einzigartige Eigenschaft dieser außergewöhnlichen Regulatorproteine. Beide besitzen mindestens zwei verschiedene HTH-Motive und erkennen ihre jeweiligen Zielpromotoren mit unterschiedlichen Helices innerhalb ihrer N-terminalen DNA-Bindedomänen. *In vitro* Experimente belegten, dass TrmB mit seiner HTH 1-Struktur (AS 33–54) an den TM-Promotor bindet, wobei das Tyrosin an Position 50 essentiell zur Promotorerkennung ist. Der MD-Promotor wird dagegen mit der HTH 2-Struktur (AS 83–104) erkannt und gebunden, wobei das Glutamat an Position 87 eine entscheidende Rolle spielt.

Auch TrmBL1 besitzt zwei verschiedene Bindehelices. Die HTH 1-Struktur (AS 32–53) scheint bei der Erkennung von Promotoren mit TGM-Motiv ausschlaggebend zu sein, während über die HTH 2-Struktur (AS 80–99) Promotoren ohne TGM-Motiv gebunden werden.

VI. Summary

In the present work the regulatory mechanism of the two sugar-specific transcriptional regulators TrmB and TrmBL1 of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* was examined.

In *P. furiosus* the uptake of carbohydrates into the cell is mediated by two substrate-specific ABC transporters. The maltose/trehalose (TM) transporter is responsible for the uptake of maltose and trehalose only, whereas the maltodextrin (MD) transporter is specific for maltodextrins. On the genetic level both transporters are organized in gene clusters with TrmB and TrmBL1 controlling their expression. The results of *in vitro* experiments provided evidence that both regulators bind to the respective operator sites and thus inhibit transcription by preventing further binding of transcription factors and RNA polymerase recruitment. The TrmB-mediated repression of transcription on the TM promoter is released by maltose and trehalose, whereas maltodextrins and sucrose are inducers for the MD promoter. For TrmBL1 maltose acts as inducer for both promoters.

Apart from the already mentioned inducers promoter-specific co-repressors also were identified for TrmB. Glucose acts as an anti-inducer for both TM and MD promoter by enhancing the binding of the repressor to the DNA and thus increasing TrmB-mediated inhibition of transcription. Furthermore it could be shown that the inducers of the TM system act as anti-inducers for the MD system and vice versa.

TrmBL1 is homologue to TrmB and is involved in the regulation of genes encoding glycolytic and gluconeogenic enzymes, respectively, where it recognizes a conserved sequence motif called TGM. In contrast to TrmB, which proved to only inhibit transcription, TrmBL1 can act both as repressor and activator.

The results of this work show that the expression of the glycolytic enzyme phosphofructokinase (PFK) is repressed, when TrmBL1 binds to the respective promoter region with maltose, maltotriose, and fructose being inducers and releasing TrmBL1-mediated inhibition of transcription. On the other hand TrmBL1 activates transcription of the gene encoding the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase). Thus TrmBL1 is a repressor for glycolysis and an activator for gluconeogenesis. It is postulated that the position of the TGM motif downstream or upstream of the BRE/TATA box defines whether TrmBL1 represses or activates transcription.

DNaseI footprinting as well as *in vitro* transcription assays proved that TrmB also binds to the PFK promoter and inhibits transcription on this promoter.

In addition, it could be shown that TrmBL1 autoregulates its own expression by binding to its promoter and repressing transcription with glucose acting as inducer. Since the TGM is not present in the promoter region of the TrmBL1 gene, this motif is not essential for TrmBL1 promoter recognition.

The results of this work provide evidence that TrmBL1 recognizes the target promoters of TrmB and vice versa. This implies that both regulators play a crucial role in the cross regulatory network of sugar metabolism in *P. furiosus*. Furthermore this work revealed that TrmB and TrmBL1 share unique properties that have been described for the first time for prokaryotic regulators. Both regulators recognize different nucleotide sequences on different promoters and show distinctive, promoter-dependent sugar specificity. It is postulated here that these regulators take up different conformations when binding to different nucleotide sequences and consequently also recognize different inducers in a promoter-dependent manner.

A mutational analysis of the DNA binding domain of both TrmB and TrmBL1 revealed another unique feature of these exceptional regulator proteins. Each of them has at least two different HTH motifs and recognizes its respective target promoters with different helices within its N-terminal DNA binding domain.

In vitro experiments proved that TrmB binds with its HTH 1 region (AS 33–54) to the TM promoter with the tyrosine on position 50 being essential for promoter recognition. The MD promoter, however, is bound with another region, the HTH 2 (AS 83–104), with the glutamate on position 87 being crucial for promoter binding. Also TrmBL1 has two different binding helices, with the HTH 1 region (AS 32–53) being involved in the binding to promoters with a TGM, and the HTH 2 region (AS 80–99) recognizing promoters without a TGM.

VII. Literaturverzeichnis

Abella M., Rodríguez S., Paytubi S., Campoy S., White M.F., Barbé J. (2007). The *Sulfolobus solfataricus radA* paralogue *sso0777* is DNA damage inducible and positively regulated by Sta1 protein. *Nucleic Acids Res.* **35(20)**: 6788–6797.

Albers S.-V., Koning S.M., Konings W.N., Driessen A.J.M. (2004). Insights Into ABC Transport in Archaea. *J. Bioenergetics and Biomembranes.* **36(1)**: 5–15.

Aravind L., Koonin E.V. (1999). DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in archaea. *Nucl. Acids Res.* **27(23)**: 4658–4670.

Baliga N.S., Kennedy S.P., Ng W.V., Hood L., DasSarma S. (2001). Genomic and genetic dissection of an archaeal regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98(5)**: 2521–2525.

Bauer M., Marschaus L., Reuff M., Besche V., Sartorius-Neef S., Pfeifer F. (2008). Overlapping activator sequences determined for two oppositely oriented promoters in halophilic Archaea. *Nucleic Acids Res.* **36(2)**: 598–606.

Barlett M.S., Thomm M., Geiduschek E.P. (2004). Topography of the Euryarchaeal Transcription Initiation Complex. *J. Biol. Chem.* **279(7)**: 5894–5903.

Bell, S.D. (2005). Archaeal transcriptional regulation–variation on a bacterial theme? *Trends Microbiol.* **13**: 262–265.

Bell S.D., Cairns S.S., Robson R.L., Jackson S.P. (1999). Transcriptional Regulation of an Archaeal Operon *In Vivo* and *In Vitro*. *Mol. Cell.* **4**: 971–982.

Bell S.D., Jackson S.P. (2000). Mechanism of Autoregulation by an Archaeal Transcriptional Repressor. *J. Biol. Chem.* **275(41)**: 31624–31629.

Bell S.D., Jackson S.P. (2001). Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 208–213.

Bell S.D., Kosa P.L., Sigler P.B., Jackson S.P. (1999). Orientation of the transcription complex in archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96(24)**: 13662–13667.

Berensmeier S., Theilacker N. (2007). Magnetic particles for separation and purification of nucleic acids. *Bio Tech International.* **19(1)**: 6–10.

Best A.A., Olsen G.J. (2001). Similar subunit architecture of archaeal and eukaryal RNA polymerase. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**: 85–90.

Böhm A., Boos W. (2004). Gene regulation in prokaryotes by subcellular relocalization of transcription factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **7 (2)**: 151–156.

Boos W., Böhm A. (2000). Learning new tricks from an old dog: MalT of the *Escherichia coli* maltose system is part of a complex regulatory network. *Trends Genet.* **16**: 404–409.

Boos W., Shuman H.A. (1998). Maltose/Maltodextrin System of *Escherichia coli*: Transport, Metabolism, and Regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 204–229.

Borths E.L., Locher K.P., Lee A.T., Rees D.C. (2002). The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99(26)**: 16642–16647.

Brinkman A.B., Bell S.D., Lebbink R.J., de Vos W.M., van der Oost J. (2002). The *Sulfolobus solfataricus* Lrp-like Protein LysM Regulates Lysine Biosynthesis in Response to Lysine Availability. *J. Biol. Chem.* **277(33)**: 29537–29549.

Brinkman A.B., Dahlke I., Tuininga J.E., Lammers T., Dumay V., de Heus E., Lebbink J.H.G., Thomm M., de Vos W.M., van der Oost J. (2000). An Lrp-like Transcriptional Regulator from the Archaeon *Pyrococcus furiosus* Is Negatively Autoregulated. *J. Biol. Chem.* **275(49)**: 38160–38169.

Brown S.H., Kelly R.M. (1993). Characterization of Amylolytic Enzymes, Having Both α -1,4 and α -1,6 Hydrolytic Activity, from the Thermophilic Archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2614–2621.

Campell E.A., Westblade L.F., Darst S.A. (2008). Regulation of bacterial RNA polymerase σ factor activity: a structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* **11(2)**: 121–127.

Costantino H.R., Brown S.H., Kelly R.M. (1990). Purification and Characterization of an α -Glucosidase from a Hyperthermophilic Archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, Exhibiting a Temperature Optimum of 105 to 115°C. *J. Bacteriol.* **172(7)**: 3654–3660.

Dahlke I. and Thomm M. (2002). A *Pyrococcus* homolog of the leucine-responsive regulatory protein, LrpA, inhibits transcription by abrogating RNA polymerase recruitment. *Nucleic Acids Research* **30(3)**: 701–710.

Diederichs K., Diez J., Greller G., Müller C., Breed J., Schnell C., Vonnheim C., Boos W., Welte W. (2000). Crystal structure of Malk, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. *EMBO J.* **19**: 5951–5961.

Diez J., Diederichs K., Greller G., Horlacher R., Boos W., Welte W. (2001). The Crystal Structure of a Liganded Trehalose/Maltose-binding Protein from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis* at 1.85 Å. *J. Mol. Biol.* **305**: 905–915.

Dippel R., Boos W. (2005). The maltodextrin system of *Escherichia coli*: metabolism and transport. *J. Bacteriol.* **187(24)**: 8322–8331.

DiRuggiero J., Dunn D., Maeder D.L., Holley-Shanks R., Chatard J., Horlacher R., Robb F.T., Boos W., Weiss R.B. (2000). Evidence of recent lateral gene transfer among hyperthermophilic archaea. *Mol. Microbiol.* **38(4)**: 684–693.

Evdokimov A.G., Anderson D.E., Routzahn K.M., Waugh D.S. (2001). Structural Basis for Oligosaccharide Recognition by *Pyrococcus furiosus* Maltodextrin-Binding Protein. *J. Mol. Biol.* **305(4)**: 891–904.

Fiala G., Stetter K.O. (1996). *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Arch. Microbiol.* **145**: 56–61.

Forterre P., Confalonieri F., Charbonnier F., Duguet M. (1995). Speculations on the origin of life and thermophily: Review of available information on reverse gyrase suggests that hyperthermophilic prokaryotes are not so primitive. *Origins Life Evol. Biosphere.* **25**: 235–249.

Geiduschek E.P., Ouhammouch M. (2005). Archaeal transcription and its regulators. *Mol. Microbiol.* **56**: 1397–1407.

Gindner A. (2009). Untersuchungen zur Funktion der Transkriptionsregulator-Familie TrmB und anderen Regulatoren in *Pyrococcus furiosus*. Diplomarbeit. Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Regensburg.

Gohl H.P., Gröndahl B., Thomm M. (1995). Promoter recognition in archaea is mediated by transcription factors: identification of transcription factor aTFB from *Methanococcus thermolithotrophicus* as archaeal TATA-binding protein. *Nucleic Acids Res.* **23(19)**: 3837–3841.

Greller G., Horlacher R., DiRuggiero J., Boos W. (1999). Molecular and Biochemical Analysis of Malk, the ATP-Hydrolysing Subunit of the Trehalose/Maltose Transport System of the Hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J. Biol. Chem.* **274**: 20259-20264.

Grünberg S., Bartlett M.S., Naji S., Thomm M. (2007). Transcription Factor E Is a Part of Transcription Elongation Complexes. *J. Biol. Chem.* **282(49)**: 35482–35490.

Haseltine C., Rolsmeier M., Blum P. (1996). The Glucose Effect and Regulation of α -Amylase Synthesis in the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* **178**: 945–950.

Hausner W., Thomm M. (1993). Purification and characterization of a general transcription factor, aTFB, from the Archaeon *Methanococcus thermolithotrophicus*. *J. Biol. Chem.* **268**: 24047–24052.

Hausner W., Thomm M. (2001). Events during Initiation of Archaeal Transcription: Open Complex Formation and DNA-Protein Interactions. *J. Bacteriol.* **183(10)**: 3025–3031.

Hausner W., Wettach J., Hethke C., Thomm M. (1996). Two Transcription Factors Related with the Eukaryal Transcription Factors TATA-binding Protein and Transcriptional Factor IIB Direct Promoter Recognition by an Archaeal RNA Polymerase. *J. Biol. Chem.* **271(47)**: 30144–30148.

Hellman L.M., Fried M.G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nature Protocols* **Vol.2 NO.8**: 1849–1860.

Hethke C., Bergerat A., Hausner W., Forterre P., Thomm M. (1999). Cell-Free Transcription at 95°C: Thermostability of Transcriptional Components and DNA Topology Requirements of *Pyrococcus* Transcription. **152(4)**: 1325–1333.

Hethke C., Geerling A.C.M., Hausner W., de Vos W.M., Thomm M. (1996). A cell-free transcription system for the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucl. Acids Res.* **24(12)**: 2369–2376.

Horlacher R., Xavier K.B., Santos H., DiRuggiero J., Kossmann M., Boos W. (1998). Archaeal Binding Protein-Dependent ABC Transporter: Molecular and Biochemical Analysis of the Trehalose/Maltose Transport System of the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*. *J. Bacteriol.* **180(3)**: 680–689.

Imamura R., Jeon B.-S., Wakagi T. (2004). Molecular evolution of the ATPase subunit of three archaeal sugar ABC transporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**: 230–234.

Kanai T., Akerboom J., Takedomi S., van de Werken H.J.G., Blombach F., van der Oost J., Murakami T., Atomi H., Imanka T. (2007). A Global Transcriptional Regulator in *Thermococcus kodakaraensis* Controls the Expression Levels of Both Glycolytic and Gluconeogenic Enzyme-encoding Genes. *J. Biol. Chem.* **282(46)**: 33659–33670.

Keeling P.J., Doolittle W.F. (1995). Archaea: narrowing the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Proc. Natl.Acad.Sci.* **92(13)**: 5761–5764.

Keese A. (2009). Identifizierung neuer Zielgene des Hitzeschockregulators Phr und Charakterisierung des Regulators des Schwefelstoffwechsels SurR aus *Pyrococcus furiosus*. Doktorarbeit. Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Regensburg.

Kengen S.W.M., Tuininga J.E., de Bok F.A.M., Stams A.J.M., de Vos W.M. (1995). Purification and Characterization of a Novel ADP-dependent Glucokinase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* **270**: 30453–30457.

Kessler A., Sezonov G., Guijarro J.I., Desnoues N., Rose T., Delepierre M., Bell S. D., Prangishvili D. (2006). A novel archaeal regulatory protein, Sta1, activates transcription from viral promoters. *Nucleic Acids Res.* **34(17)**: 4837–4845.

Koga S., Yoshioka I., Sakuraba H., Takahashi M., Sakasegawa S., Shimizu S., Ohshima T. (2000). Biochemical Characterization, Cloning, and Sequencing of ADP-Dependent (AMP-Forming) Glucokinase from Two Hyperthermophilic Archaea, *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *J. Biochem.* **128**: 1079–1085.

Koike H., Ishijima S.A., Clowey L., Suzuki M. (2004). The archaeal feast/famine regulatory protein: potential roles of its assembly forms for regulating transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101(9)**: 2840–2845.

Koning S.M. (2003). The ABC of ABC-transport in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Dissertation.

Koning S.M., Albers S.-V., Konings W., Driessen A.J.M. (2002). Sugar transport in (hyper)thermophilic archaea. *Res. Microbiol.* **153(2)**: 61–67.

Koning S.M., Elferink M.G.L., Konings W., Driessen A.J.M. (2001). Cellobiose uptake in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is mediated by an inducible, high-affinity ABC transporter. *J. Bacteriol.* **183(17)**: 4979–4984.

Koning S.M., Konings W., Driessen A.J.M. (2002). Biochemical evidence for the presence of two α -glucoside ABC-transport systems in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Archaea* **1**: 19–25.

Krug M., Lee S.-J., Diederichs K., Boos W., Welte W. (2006). Crystal Structure of the Sugar Binding Domain of the Archaeal Transcriptional Regulator TrmB. *J. Biol. Chem.* **281(16)**: 10976–10982.

Krüger K., Hermann T., Armbruster V., Pfeifer F. (1998). The Transcriptional Activator GvpE for the Halobacterial Gas Vesicle Genes Resembles a Basic Region Leucine-zipper Regulatory Protein. *J. Mol. Biol.* **279**: 761–771.

Kyrpides N.C., Ouzounis C.A. (1999). Transcription in Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96(15)** : 8545–8550.

Kyrpides N.C., Ouzounis C.A. (1995). The eubacterial transcriptional activator Lrp is present in the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Trends Biochem. Sci.* **20(4)**: 140–141.

Laderman K.A., Asada K., Uemori T., Mukai H., Taguchi Y., Kato I., Anfinson C.B. (1993). α -Amylase from the Hyperthermophilic Archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. Cloning and Sequencing of the Gene and Expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**: 24402–24407.

Lamosa P., Martins L.O., DaCosta M.S., Santos H. (1998). Effects of Temperature, Salinity, and Medium Composition on Compatible Solute Accumulation by *Thermococcus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3591–3598.

Langer D., Hain J., Thuriaux P., Zillig W. (1995). Transcription in archaea : similarity to that in eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92(13)**: 5768–5772.

Lee H.-S., Shockley K.R., Schut G.J., Connors S.B., Montero C.I., Johnson M.R., Chou C.-J., Bridger S.L., Wigner N., Brehm S.D., Jenney F.E., Jr., Comfort D.A., Kelly R.M., Adams M.W.W. (2006). Transcriptional and Biochemical Analysis of Starch Metabolism in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* **188 (6)**: 2115–2125.

Lee S.-J., Engelmann A., Horlacher R., Qu Q., Vierke G., Hebbeln C., Thomm M., Boos W. (2003). TrmB, a Sugar-specific Transcriptional Regulator of the Trehalose/Maltose ABC-Transporter from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*. *J. Biol. Chem.* **278(2)**: 983–990.

Lee S.-J., Moulakakis C., Koning S.M., Hausner W., Thomm M., Boos W. (2005). TrmB, a sugar sensing regulator for ABC transporter genes in *Pyrococcus furiosus* exhibits dual promotor specificity and is controlled by different inducers. *Mol. Microbiol.* **57**: 1797–1807.

Lee S.-J., Surma M., Hausner W., Thomm M., Boos W. (2008). The role of TrmB and TrmB-like transcriptional regulators for sugar transport and metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Arch. Microbiol.* **190**: 247–256.

Lee S.-J., Surma M., Seitz S., Hausner W., Thomm M., Boos W. (2007a). Differential signal transduction via TrmB, a sugar sensing transcriptional repressor of *Pyrococcus furiosus*. *Mol. Microbiol.* **64(6)**: 1499–1505.

Lee S.-J., Surma M., Seitz S., Hausner W., Thomm M., Boos W. (2007b). Characterization of the TrmB-like protein, PF0124, a TGM-recognizing global transcriptional regulator of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Mol. Microbiol.* **65(2)**: 305–318.

Leonard P.M., Smits S.H.J., Sedelnikova S.E., Brinkman A.B., de Vos W.M., van der Oost J., Rice D.W., Rafferty J.B. (2001). Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *EMBO J.* **20(5)**: 990–997.

Leuschner C., Antranikian G. (1995). Heat-shock enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms. *World J. Microbiol. Biotech.* **11**: 95–114.

Lewis M., Chang G., Horton N.C., Kercher M.A., Pace H.C., Schumacher M.A., Brennan R.G., Lu P. (1996). Crystal Structure of the Lactose Operon Repressor and Its Complexes with DNA and Inducer. *Science.* **271(5253)**: 1247–1254.

Lie T.J., Wood G.E., Leigh J.A. (2005). Regulation of *nif* Expression in *Methanococcus maripaludis*. *J. Biol. Chem.* **280(7)**: 5236–5241.

Lipscomb G.L., Keese A., Cowart D.M., Schut G.J., Thomm M., Adams M.W.W., Scott R.A. (2009). SurR: a transcriptional activator and repressor controlling hydrogen and elemental sulphur metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *Mol. Microbiol.* **71(2)**: 332–349.

Lubelska J.M., Jonuscheit M., Schleper C., Albers S.V., Driessen A. (2006). Regulation of expression of the arabinose and glucose transporter genes in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* **10**: 383–391.

Meadow N.D., Fox D.K., Roseman S. (1990). The bacterial Phosphoenolpyruvate: glyucose phosphotransferase system. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 497–542.

Mizanur R.M., Griffin A.K.K., Pohl N.L. (2007). Recombinant production and biochemical characterization of a hyperthermostable α -glucan/maltodextrin phosphorylase from *Pyrococcus furiosus*. *Archaea* **2**: 169–176.

Moulakakis C. (2004). Untersuchungen zur Regulation des Zuckertransportes in *Pyrococcus fudiosus*. Diplomarbeit.

Napoli A., Van der Oost J., Sensen C. W., Charlebois R. L., Rossi M., Ciaramella M. (1999). An Lrp-Like Protein of the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* Which Binds to Its Own Promoter. *J. Bacteriol.* **181(5)**: 1474–1480.

Neuner A., Jannasch H.W., Belkin S., Stetter K. (1990). *Thermococcus litoralis* sp. nov.: A new species of extremely thermophilic marine archaeobacteria. *Arch. Microbiol.* **153**: 205–207.

Newman E.B., Lin R. (1995). Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. Coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 747–775.

Noll K.M., Lapierre P., Gogarten J.P. Nanavati D.M. (2008). Evolution of *mal* transporter operons in the *Thermococcales* and *Thermotogales*. *BMC Evol. Biol.* **8:7**

Ouhammouch M. (2004). Transcriptional regulation in Archaea. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**: 133–138.

Ouhammouch M., Dewhurst R.E., Hausner W., Thomm M., Geiduschek E.P. (2003). Activation of archaeal transcription by recruitment of the TATA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 5097–5102.

Ouhammouch M., Hausner W., Geiduschek E. (2008). TBP domain symmetry in basal and activated archaeal transcription. *Mol. Microbiol.* **71(1)**: 123–131.

Ouhammouch M., Langham G.E., Hausner W., Simpson A.J., El-Sayed N.M.A., Geiduschek E.P. (2005). Promotor architecture and response to a positive regulator of archaeal transcription. *Mol. Microbiol.* **56(3)**: 625–637.

Pajatsch M., Gerhart M., Peist M., Horlacher R., Boos W., Böck A. (1998). The Periplasmic Cyclodextrin Binding Protein CymE from *Klebsiella oxytoca* and Its Role in Maltodextrin and Cyclodextrin Transport. *J. Bacteriol.* **180**: 2630–2635.

Poole F.L. II, Gerwe B.A., Hopkins R.C., Schut G.J., Weinberg M.V., Jenney F.E., Jr., Adams M.W.W. (2005). Defining Genes in the Genome of the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*: Implication for All Microbial Genomes. *J. Bacteriology.* **187(21)**: 7325–7332.

Postma P.W., Lengeler J.W., Jacobson G.R. (1993). Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 543–594.

Qu Q., Lee S.-J., Boos W. (2004a). TreT, a Novel Trehalose Glycosyltransferring Synthase of the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*. *J. Biol. Chem.* **279**: 47890–47897.

Qu Q., Lee S.-J., Boos W. (2004b). Molecular and biochemical characterization of a fructose-6-phosphate-forming and ATP-dependent fructokinase of the hyperthermophilic archaeon. *Thermococcus litoralis*. *Extremophiles*. **8**: 301–308.

Quioco F.A., Ledvina P.S. (1996). Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol. Microbiol.* **20(1)**: 17–25.

Raibaud O., Richet E. (1987). Maltotriose is the Inducer of the Maltose Regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 3059–3061.

Reeve J.N. (2003). Archaeal chromatin and transcription. *Mol. Microbiol.* **48**: 587–598.

Reichelt R. (2009). Untersuchungen zur Funktion der TrmB-Familie in *Pyrococcus furiosus* anhand von Chromatin Immunpräzipitationsexperimenten. Diplomarbeit. Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Regensburg.

Reiter W.D., Hüdepohl U., Zillig W. (1990). Mutational analysis of an archaeal promoter: essential role of a TATA box for transcription efficiency and start site selection *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87(24)**: 9509–9513.

Richet E., Vidal-Ingigliardi D., Raibaud O. (1991). A New Mechanism for Coactivation of Transcription Initiation: Repositioning of an Activator Triggered by the Binding of a Second Activator. *Cell*. **66**: 1185–1195.

Rinker K.D., Kelly R.M. (1996). Growth Physiology of the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*: Development of a Sulfur-Free Defined Medium, Characterization of an Exopolysaccharide, and Evidence of Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4478–4485.

Rowlands T., Baumann P., Jackson S.P. (1994). The TATA binding protein: a general transcription factor in eukaryotes and archaeabacteria. *Science*. **264(5163)**: 1326–1329.

Sakuraba H., Oshima T. (2002). Novel Energy Metabolism in Anaerobic Hyperthermophilic Archaea: a Modified Emden–Meyerhof Pathway. *J. Biosci. & Bioeng.* **93**: 441–448.

Schäfer T., Schönheit P. (1993). Gluconeogenesis from pyruvate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: involvement of reactions of the Emden–Meyerhof pathway. *Arch. Microbiol.* **159**: 354–363.

Schmid A.K., Reiss D.J., Pan M., Koide T., Baliga N. S. (2009). A single transcription factor regulates evolutionarily diverse but functionally linked metabolic pathways in response to nutrient availability. *Mol. Syst. Biol.* **5(282)**: 1–15.

Scholz S., Sonnenbichler J., Schäfer W., Hensel R. (1992). Di–myo–inositol–1,1′–phosphate: a novel inositol phosphate isolated from *Pyrococcus woesei*. *FEBS Lett.* **306**: 239–242.

Schut G.J., Brehm S.D., Datta S., Adams M.W.W. (2003). Whole-genome DNA microarray analysis of a hyperthermophile and an archaeon: *Pyrococcus furiosus* grown on carbohydrates or peptides. *J. Bacteriol.* **185**: 3935–3947.

Shapiro A.L., Vinuela E., Maizel J.V. Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS–polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28(5)**: 815–820.

Siebers B., Schönheit P. (2005). Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **8(6)**: 695–705.

Soppa J. (1999). Transcription initiation in archaea: facts, factors and future aspects. *Mol. Microbiol.* **31(5)**: 1295–1305.

Stetter K. O. (1999). Extremophiles and their adaption to hot environments. *FEBS Letters.* **452(1)**: 22–25.

Stülke J., Hillen W. (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 195–201.

Surma M. (2005). Untersuchungen zur Funktion des Transkriptionsfaktors TrmB aus *Pyrococcus furiosus*. Diplomarbeit. Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Regensburg.

Suzuki M. (2005). Comparison of modes of DNA-binding and bending by archaeal transcription factors, Phr, TrmB, GvpE, GvpD, NrpR, Lrs14 and MDR1. *Proc. Jpn Acad.* **81**: 334–348.

Tetas M., Lowenstein J.M. (1962). The effect of bivalent metal ions on the hydrolysis of Adenosine Di- and Triphosphate. *Biochemistry.* **2**: 350–357.

Thomm M. (1996). Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**: 159–171.

Thomm M. (2007). Transcription: mechanism and regulation. *Archaea: Molecular and Cellular Biology*. Cavicchioli R. (ed). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 139–157.

Thomm M., Reich C., Grünberg S., Naji S. (2009). Mutational studies of archaeal RNA polymerase and analysis of hybrid RNA polymerases. *Biochem. Soc. Trans.* **37(1)**: 18–22.

Thomm M., Wich G. (1988). An archaeal promotor element for stable RNA genes with homology to the TATA box of higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **16(1)**: 151–163.

van de Werken H.J., Verhees C.H., Akerboom J., de Vos W.M., van der Oost J. (2006). Identification of a glycolytic regulon in the archaea *Pyrococcus* and *Thermococcus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **260**: 69–76.

Verhees C.H., Kengen S.W.M., Tuininga J.E., Schut G.J., Adams M.W.W., de Vos W.M., van der Oost J. (2003). The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochem. J.* **375**: 231–246.

Vierke G., Engelmann A., Hebbeln C., Thomm M. (2003). A Novel Archaeal Transcriptional Regulator of Heat Shock Response. *J. Biol. Chem.* **278(1)**: 18–26.

Voorhorst W.G.B., Gueguen Y., Geerling A.C.M., Schut G., Dahlke I., Thomm M., van der Oost J., de Vos W.M. (1999). Transcriptional Regulation in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*: Coordinated Expression of Divergently Oriented Genes in Response to β -Linked Glucose Polymers. *J. Bacteriol.* **181**: 3777–3783.

Wan X.-F., Bridges S.M., Boyle J.A. (2004). Revealing gene transcription and translation initiation patterns in archaea, using an interactive clustering model. *Extremophiles* **8(4)**: 291–299.

Wettach J., Gohl H.P., Tschochner H., Thomm M. (1995). Functional interaction of yeast and human TATA-binding proteins with an archaeal RNA polymerase and promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92(2)**: 472–476.

Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87(12)**: 4576–4579.

Woychik N.A., Hampsey M. (2002). The RNA Polymerase II Machinery: Structure Illuminates Function. *Cell*. **108(4)**: 453–463.

Xavier K.B., Martins L.O., Peist R., Kossmann M., Boos W., Santos H. (1996). High-affinity maltose/trehalose transport system in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J. Bacteriol.* **178(16)**: 4773–4777.

Xavier K.B., Peist R., Kossmann M., Boos W., Santos H. (1999). Maltose Metabolism in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*: Purification and Characterization of Key Enzymes. *J. Bacteriol.* **181(11)**: 3358–3367.

Xie Y., Reeve J.N. (2005). Regulation of Tryptophan Operon Expression in the Archaeon *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. *J. Bacteriol.* **187(18)**: 6419–6429.

VIII. Anhang

1. Abkürzungen

1.1. Allgemeine Abkürzungen

Abb.	<u>A</u>bbildung
ABC	<u>A</u>TP <u>B</u>inding <u>C</u>assette (engl.)
APS	<u>A</u>mmonium<u>P</u>eroxidi<u>S</u>ulfat
AS	<u>A</u>mino<u>S</u>äure
ATP	<u>A</u>denosin<u>T</u>ri<u>P</u>hospat
<i>bidest</i>	<u>b</u>id<u>e</u>st<u>i</u>llata (lat.), zweifach destilliert
BLAST	<u>B</u>asic <u>L</u>ocal <u>A</u>lignment <u>S</u>earch <u>T</u>ool (engl.)
bp	<u>b</u>ase <u>p</u>air(s) (eng.), Basenpaar(e)
BRE	Transcription Factor <u>B</u> <u>R</u>ecognition <u>E</u>lement (engl.) TFB Erkennungselement
BSA	<u>B</u>ovine <u>S</u>erum <u>A</u>lbumin (engl.), Rinderserumalbumin
Ci	<u>C</u>ur<u>i</u>e
CTP	<u>C</u>ytidin<u>T</u>ri<u>P</u>hospat
Da	<u>D</u>alton
DNA	<u>D</u>esoxyribo <u>N</u>ucleic <u>A</u>cid (engl.), Desoxyribonukleinsäure
dNTP	<u>D</u>esoxyribo<u>N</u>ukleosid<u>T</u>ri<u>P</u>hospat
DPE	<u>D</u>ownstream <u>P</u>romoter <u>E</u>lement (engl.)
DTT	<u>D</u>i<u>T</u>hio<u>T</u>hreithol
<i>E. coli</i>	<u>E</u>scherichia <u>c</u>oli
EDTA	<u>E</u>thylene<u>D</u>iamine<u>T</u>etraacetic <u>A</u>cid (engl.), Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<u>E</u>lectrophoretic <u>M</u>obility <u>S</u>hift <u>A</u>ssay (engl.)
<i>et al.</i>	<u>e</u>t <u>a</u>lii (lat.), und andere
FBPase	<u>F</u>ructose-1,6-<u>B</u>is<u>P</u>hospat<u>a</u>se
g	<u>G</u>ramm
GAPDH	<u>G</u>lycerin<u>A</u>ldehyd-3-<u>P</u>hospat-<u>D</u>e<u>H</u>ydrogenase
<i>gdh</i>	<u>G</u>lutamat-<u>D</u>e<u>h</u>ydrogenase
GTP	<u>G</u>uanosin<u>T</u>ri<u>P</u>hospat

HEPES	2-(4-(2- H ydroxy E thyl)-1- P iperazinyl)- E thansulfon S äure
HTH	H elix- T urn- H elix (engl.)
INR	I nitiator-Element
IPTG	I sopropyl- β -D- t hiogalactopyranosid
kb	K ilobasen
kDa	k ilo- D alton
LB	L uria B ertani
LrpA	L eu c ine- R esponsive- R egulatory- P rotein A (engl.)
M	m olar
mA	M illiampere
mal	M altose
mAU	m illi A bsorption U nits (engl.)
Mb	M egabasen
MD	M altodextrin
MDR1	M etal- D ependent- R epressor 1 (engl.), metallabhängiger Repressor 1
mdx	M altodextrin
min	M inute
<i>M. jannaschii</i>	M ethanococcus <i>jannaschii</i>
ml	M illiliter
mM	M illimolar
μ M	M ikromolar
mRNA	m essenger R NA
NADP	N icotinsäureamid- A denin- D inukleotid- P hosphat
nm	N anometer
nM	N anomolar
NTP	N ukleotid T ri P hosphat
ORF	O pen R eadin G F rame (engl.) Offener Leserahmen eines Gens
PA	P oly A crylamid
PAGE	P oly A crylamid- G el E lektrophorese
PCR	P olymerase C hain R eaction (engl.), Polymerasekettenreaktion
PEP	P hospho E no L Pyruvat
PF	P yroccoccus f uriosus
PFK	P hospho F ructo K inase
<i>P. furiosus</i>	P yroccoccus <i>f</i>uriosus
<i>pfu</i>	P yroccoccus <i>f</i>uriosus
PGK	P hospho G lycerat K inase

pH	negative dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
Phr	<i>Pyrococcus Heat Shock Regulator</i> (engl.), <i>Pyrococcus</i> Hitzeschock-Regulator
PMSF	P henyl M ethyl S ulfonyl F luorid
PNK	P oly N ukleotid K inase
Ptr2	<i>Putative Transcription Regulator 2</i> (engl.)
PTS	P hospho T ransferase S ystem
RNA	<i>RiboNucleic Acid</i> (engl.), Ribonukleinsäure
RNAP	RNA - P olymerase
rpm	<i>rounds per minute</i> (engl.), Umdrehungen pro Minute
RT	R aum T emperatur
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (engl.), Natriumdodecylsulfat
SurR	<i>Sulphur Response Regulator</i> (engl.)
Tab.	T abelle
TBE	T ris- B orat- E DTA
TBP	<i>TATA-Box-Binding-Protein</i> (engl.)
TCA	T richlor a cetat
TE	T ris- E DTA
TEMED	T Etra M ethyl E thylen D iamin
TFB	<i>Transcription Faktor B</i> (engl.)
TFE	<i>Transcriptions Faktor E</i> (engl.)
TGM	<i>Thermococcales Glycolytic Motif</i> (engl.)
Tgr	<i>Thermococcales glycolytic regulator</i> (engl.)
<i>T. kodakaraensis</i>	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>
TM	T rehalose/ M altose
Tris	T ris-(hydroxymethy-)aminoethan
TrmB	T ranscriptional r egulator of the m altose system B
TrmBL1	T rm B - L ike 1
TrmBL2	T rm B - L ike 2
TrmBL3	T rm B - L ike 3
TTP	T hymidin T ri P hospat
U	<i>Units</i> (engl.)
UTP	U ridin T ri P hospat
UV	U lta V iolett
V	V olt
v/v	<i>volume/volume</i> (engl.), Volumen/Volumen

wt	<u>w</u> ild <u>t</u> ype (engl.), Wildtyp
w/v	<u>w</u> eight/ <u>v</u> olume (engl.), Gewicht/Volumen

1.2. Symbole für den Nukleinsäurecode

A	Desoxyadenosin
C	Desoxycytidin
G	Desoxyguanosin
T	Desoxythymidin

1.3. Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

2. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei **Herrn Prof. Dr. Michael Thomm** für die Vergabe dieses interessanten Themas und für die Möglichkeit bedanken, die vorliegende Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen. Seine große Unterstützung und nette Betreuung haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei **Herrn PD Dr. Winfried Hausner** für seine Unterstützung während meiner Zeit als Doktorandin.

Ein großer Teil dieser Arbeit entstand in Kooperation mit **Herrn Prof. Dr. Winfried Boos** und **Herrn Prof. Dr. Wolfram Welte** von der Universität in Konstanz, sowie mit **Dr. Sung-Jae Lee** von der Kyung Hee University in Seoul, Korea. Bei ihnen möchte ich mich ganz herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle Mitarbeiter des Lehrstuhls Mikrobiologie im Allgemeinen und an meine Laborkollegen im Besonderen für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima. Vor allem bei **Renate Richau**, **Wolfgang Forster** und **Elisabeth Nagelfeld** möchte ich mich herzlich bedanken - für die vielfältige Unterstützung und Hilfe bei allen möglichen Fragen und Problemen, sowie die vielen netten Worte und Gespräche, die mir so manchen Arbeitstag versüßt haben.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei **Antonia Gindner**, **Robert Reichelt** und **Stefan Eisenschink**, die bei der Aufreinigung bzw. Herstellung der TrmB- und TrmBL1-Mutanten geholfen haben.

Vielen lieben Dank auch an meine Freunde, besonders an **Tarja Turunen**, **Marcelo Cabuli**, **Monika Haag** und alle **Mitglieder der Hofdanserey Burghausen**, die mich gerade in stressigen Zeiten immer wieder mit neuer Energie versorgten.

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch meinen Eltern, **Erich und Regina Surma**, für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Liebe während des Studiums, der Doktorarbeit und allen anderen Bereichen meines Lebens.

3. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Teilergebnisse dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:

Lee S.-J., Surma M., Seitz S., Hausner W., Thomm M., Boos W. (2007a). Differential signal transduction via TrmB, a sugar sensing transcriptional repressor of *Pyrococcus furiosus*. *Mol. Microbiol.* **64**(6): 1499–1505.

Lee S.-J., Surma M., Seitz S., Hausner W., Thomm M., Boos W. (2007b). Characterization of the TrmB-like protein, PF0124, a TGM-recognizing global transcriptional regulator of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Mol. Microbiol.* **65**(2): 305–318.

Lee S.-J., Surma M., Hausner W., Thomm M., Boos W. (2008). The role of TrmB and TrmB-like transcriptional regulators for sugar transport and metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Arch. Microbiol.* **190**: 247–256.

Regensburg, im April 2010